



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

ANISAKIS SPP.: RELEVÂNCIA DA SUA PESQUISA E IDENTIFICAÇÃO EM PEIXES

Tiago Alexandre Leandro Gomes

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

ORIENTADOR

Doutora Maria Gabriela Lopes Veloso

Dr. António Pedro Correia Margarido

Doutor Fernando Ribeiro Alves Afonso

CO-ORIENTADOR

Dr. António Pedro Correia Margarido

Doutor Fernando Manuel D'Almeida Bernardo

2014

LISBOA



UNIVERSIDADE DE LISBOA

Faculdade de Medicina Veterinária

ANISAKIS SPP.: RELEVÂNCIA DA SUA PESQUISA E IDENTIFICAÇÃO EM PEIXES

Tiago Alexandre Leandro Gomes

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

CONSTITUIÇÃO DO JÚRI

ORIENTADOR

Doutora Maria Gabriela Lopes Veloso

Dr. António Pedro Correia Margarido

Doutor Fernando Ribeiro Alves Afonso

CO-ORIENTADOR

Dr. António Pedro Correia Margarido

Doutor Fernando Manuel D'Almeida Bernardo

LISBOA

2014

Aos meus pais

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Fernando Manuel D'Almeida Bernardo, pela incansável e pronta ajuda que disponibilizou ao longo do processo de elaboração desta dissertação sempre de forma amável e alegre. Pela fonte de inspiração que representou e sempre representará ao longo da minha vida académica, profissional e pessoal.

Ao Dr. António Pedro Correia Margarido, meu orientador, pela disponibilidade e boa disposição permanentes com que me recebeu na DGAV e pelos ensinamentos importantes resultantes dessa experiência enriquecedora. À Dr.^a Ana Barbosa e à Eng.^a Manuela Antunes pela receptividade na lota de Peniche e um agradecimento especial aos pescadores pela generosidade na cedência do peixe analisado.

Ao Doutor Karl Marx Andaya Quiazon e ao Professor Doutor Tomoyoshi Yoshinaga, meus tutores no Laboratório de Ictiopatologia no Japão, pela inestimável oportunidade possibilitada naquela instituição, concretizando um sonho antigo e pela transmissão dos preciosos conhecimentos que foram essenciais para a materialização deste documento. A todos os funcionários e alunos da Universidade de Tóquio que me acolheram com bondade e tornaram aquele período inesquecível.

À Dr.^a Anabela Lança, pela prontidão com que me auxiliou nas minhas tarefas durante a minha permanência no Laboratório de Inspeção Sanitária, ao Professor Doutor Luís Manuel Madeira de Carvalho pelos conselhos e ajuda facultados e ao pessoal do Laboratório de Parasitologia da FMV-UL.

Ao Professor Emérito Bjørn Berland da Universidade de Bergen, Noruega, e à Professora Doutora Simonetta Mattiucci da Universidade de Roma, Itália, pela forma prestável e simpática com que me concederam esclarecimentos e fontes bibliográficas essenciais à conclusão deste trabalho.

A todos os meus amigos e colegas que caminharam a meu lado e me apoiaram ao longo desta aventura, e sem os quais não teria sido tão divertida e especial.

Aos meus pais, avós, tios e prima pelo apoio ao longo destes anos. Uma especial menção à avó Manuela e ao avô José que me ampararam e abrigaram, tornando possível a conclusão deste capítulo.

Ao Baltazar, pela paciência, cumplicidade e amizade incondicionais.

RESUMO

Anisakis spp. é considerado um dos mais importantes perigos parasitários dos produtos da pesca na medida em que é responsável pela anisakiíase. Esta zoonose, cujos efeitos gastrointestinais e alérgicos podem ter graves consequências para o ser humano, ocorre quando peixes ou cefalópodes parasitados são ingeridos crus ou confeccionados de forma deficiente. Em consequência da sua onipresença nas principais famílias de peixes e cefalópodes com interesse comercial, tornou-se imperioso o estabelecimento de criteriosas regulamentações.

Para se conhecer melhor a realidade portuguesa neste aspeto foi escolhido o carapau (*Trachurus trachurus*) para efetuar um estudo de ocorrência, intensidade e abundância parasitárias assim como uma caracterização morfométrica dos parasitas do género *Anisakis* encontrados. Dos 104 exemplares de peixe provenientes da lota de Peniche foram recolhidas 1 504 larvas tanto das vísceras como do músculo. Foi detetada uma positividade global de 67,31% e a intensidade e abundância médias foram, respetivamente, de 21,48 e 14,46. Das larvas do género *Anisakis* recolhidas 96,61% correspondiam ao tipo I (*sensu* Berland, 1961).

Atualmente, diversas técnicas moleculares são utilizadas na identificação das distintas espécies deste género parasitário como forma de caracterizar mais rigorosamente a sua ecologia e obter dados epidemiológicos mais precisos que resultem na prevenção mais eficaz desta zoonose.

Palavras-chave: *Anisakis* spp., *Trachurus trachurus*, Peniche, morfometria larvar, saúde pública.

ABSTRACT

Anisakis spp. is considered one of the most important parasitic hazards in fishery products. Being responsible for the zoonosis named anisakiasis, this nematode can cause severe gastrointestinal and allergic effects on consumers when seafood is ingested raw or undercooked. Additionally, it infects most families of commercially relevant fish and squid, generating the urge to regulate this sector through thorough legislation.

In order to further understand the situation in Portugal, it was chosen the Atlantic horse mackerel (*Trachurus trachurus*) to study some aspects of its relationship with the genus *Anisakis* in terms of parasitic frequency, intensity and abundance as well as to execute a morphometric analysis of the larvae found. Of the 104 fish specimens collected in Peniche, 67.31% harboured a total of 1 504 anisakids both in the viscera and muscle. Mean intensity and abundance were 21.48 and 14.46 (respectively) whereas *Anisakis* type I larvae (*sensu* Berland, 1961) represented 96.61% of the total number of worms analyzed.

Currently several molecular techniques are performed to identify the different species integrated in this genus as a way to more accurately characterize their ecology as well as to obtain more exact epidemiologic data in order to prevent this zoonosis more effectively.

Key words: *Anisakis* spp., *Trachurus trachurus*, Peniche, larval morphometry, public health.

ÍNDICE GERAL

AGRADECIMENTOS	i
RESUMO	ii
ABSTRACT	iii
ÍNDICE GERAL	iv
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABELAS	vii
ÍNDICE DE DIAGRAMAS, GRÁFICOS E MAPAS	viii
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	ix

A - Descrição das atividades realizadas no período de estágio	1
---	---

I. <i>Anisakis</i> spp. e os seus hospedeiros	4
---	---

1. Introdução	4
1.1. O parasita – <i>Anisakis</i> spp.	4
1.1.1. Taxonomia e identificação	5
1.1.2. Morfologia	7
1.1.3. Ciclo biológico	10
1.1.4. Patogenia	12
1.1.4.1. No hospedeiro íctio (HP)	12
1.1.4.2. No hospedeiro cetáceo (HD)	14
1.1.4.3. No Homem (HA)	14
1.2. Epidemiologia da anisaquidose	19
1.3. Aspetos sanitários	21
1.4. Enquadramento legal	25

II. Detecção, quantificação e identidade de <i>Anisakis</i> spp. em carapau (<i>Trachurus trachurus</i>) em Portugal (estudo de caso)	27
---	----

2. Introdução e objetivos	27
2.1. O hospedeiro – carapau (<i>Trachurus trachurus</i>)	28
2.1.1. Morfologia e ecologia	28
2.1.2. Stocks e capturas	32
2.1.3. Importância alimentar e económica	34
2.2. Materiais e métodos	37
2.2.1. Amostragem	37
2.2.2. Processamento	37
2.2.2.1. Necrópsia	38
2.2.2.2. Digestão artificial	38
2.2.2.3. Recolha dos anisaquídeos	39
2.2.2.4. Caracterização dos anisaquídeos	40
2.2.2.5. Análise dos dados	42
2.3. Resultados	43
2.3.1. Aspetos quantitativos	43
2.3.2. Aspetos qualitativos	45
2.4. Discussão	47

III. Métodos moleculares aplicados à identificação de anisaquídeos	59
3. Introdução	59
3.1. Eletroforese de enzimas multilocular (MEE)	59
3.2. Técnicas baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR)	61
3.2.1. Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP)	61
3.2.2. Polimorfismo de conformação de filamento único (SSCP)	62
3.2.3. Sequenciação do material genético	63
3.3. Descrição do protocolo executado no LI durante o estágio em Tóquio	64
3.3.1. Recolha e fixação das amostras	64
3.3.2. Extração do DNA e PCR	67
3.3.3. PCR-RFLP e sequenciação do DNA	66
IV. Conclusões	68
V. Bibliografia	71

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mercado grossista de Tóquio - Tsukiji	2
Figura 2. Aspectos gerais da morfologia externa do adulto de <i>Anisakis</i> spp.	9
Figura 3. Aspectos gerais da morfologia da larva L3 de <i>Anisakis</i> spp.	9
Figura 4. Anatomia externa do carapau (<i>T. trachurus</i>) (FAO, 2014c)	29
Figura 5. Etapas do procedimento de processamento das amostras	39
Figura 6. Principais parâmetros morfométricos na caracterização de <i>Anisakis</i>	41
Figura 7. Qlamp™DNA mini kit (Quiagen)	65
Figura 8. Protocolo de PCR (região ITS)	65
Figura 9. Chave molecular para a região ITS usada nos protocolos de identificação de anisquídeos por PCR-RFLP no LI, Tóquio	67
Figura 10. Chave molecular para a região <i>cox2</i> usada nos protocolos de identificação de anisquídeos por PCR-RFLP no LI, Tóquio	67

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Número de horas de contacto prático	1
Tabela 2. Repartição geográfica e zoológica das diferentes espécies de <i>Anisakis</i>	7
Tabela 3. Apresentações clínicas da anisaquiose	15
Tabela 4. Alergénios de <i>Anisakis simplex</i>	19
Tabela 5. Exemplos de processos que asseguram a inviabilização das larvas de anisaquídeos	23
Tabela 6. Técnicas usadas na deteção de anisaquídeos em produtos da pesca.....	24
Tabela 7. Composição centesimal do carapau (<i>T. trachurus</i>)	35
Tabela 8. Planificação da amostragem	37
Tabela 9. Frequência, intensidade e abundância do parasitismo nos lotes	44
Tabela 10. Parâmetros morfométricos das larvas L3 de <i>Anisakis</i> spp. do tipo I (<i>sensu</i> Berland, 1961)	46
Tabela 11. Parâmetros morfométricos das larvas L3 de <i>Anisakis</i> spp. do tipo II (<i>sensu</i> Berland, 1961)	46
Tabela 12. Comparação dos parâmetros morfométricos das larvas L3 de <i>Anisakis</i> spp. do tipo I (<i>sensu</i> Berland, 1961) com diferentes autores	54
Tabela 13. Comparação das relações entre os parâmetros morfométricos das larvas L3 de <i>Anisakis</i> spp. do tipo I (<i>sensu</i> Berland, 1961) com diferentes autores	56
Tabela 14. Comparação dos parâmetros morfométricos das larvas L3 de <i>Anisakis</i> spp. do tipo II (<i>sensu</i> Berland, 1961) com diferentes autores.....	57
Tabela 15. Comparação das relações entre os parâmetros morfométricos das larvas L3 de <i>Anisakis</i> spp. do tipo II (<i>sensu</i> Berland, 1961) com diferentes autores	57
Tabela 16. Enzimas de restrição mais usadas nos protocolos de PCR-RFLP para identificação de anisaquídeos	62

ÍNDICE DE DIAGRAMAS, GRÁFICOS E MAPAS

Diagrama 1. Fluxograma simplificado de identificação de <i>Anisakis</i> spp.	42
Diagrama 2. Distribuição das amostras positivas a anisacídeos por região anatômica dos carapaus	43
Gráfico 1. Distribuição dos tipos morfológicos das larvas de <i>Anisakis</i> spp. (<i>sensu</i> Berland, 1961) encontradas em carapau	45
Mapa 1. Localização dos principais stocks de <i>T. trachurus</i> em águas europeias	32
Mapa 2. Consumo <i>per capita</i> de produtos da pesca por território (kg/habitante/ano) – média 2008-2010	36
Mapa 3. Proveniência geográfica das amostras	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AFSSA – *Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments* (Agência Francesa de Segurança Alimentar)

BID – *Bis in diem* (duas vezes ao dia)

CC – Comprimento da cauda

CE – Comprimento do esófago

CM – Comprimento do *mucron*

cox1 – Citocromo c-oxidase subunidade 1

cox2 – Citocromo c-oxidase subunidade 2

CT – Comprimento total

CV – Comprimento do ventrículo

DGAV – Direção-Geral de Alimentação e Veterinária

DNA – *Deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico)

EFSA – *European Food Safety Authority* (Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar)

ELISA – *Enzyme-linked immunosorbent assay* (Ensaio imunoenzimático)

EV – Espessura do ventrículo

HA – Hospedeiro(s) accidental(ais)

HCl – Ácido clorídrico

HD – Hospedeiro(s) definitivo(s)

HI – Hospedeiro(s) intermediário(s)

HP – Hospedeiro(s) paraténico(s)

IBD – *Inflammatory bowel disease* (Doença inflamatória intestinal)

IgE – Imunoglobulina E

IgG – Imunoglobulina G

ITS – *Internal transcribed spacer* (Espaçador transcrito interno)

Kcal – Kilocaloria(s)

L1 – Primeiro estágio larvar

L2 – Segundo estágio larvar

L3 – Terceiro estágio larvar

L4 – Quarto estágio larvar

LI – Laboratório de Ictiopatologia (Universidade de Tóquio)

MEE – *Multilocus enzyme electrophoresis* (Eletroforese de enzimas multilocular)

MPa – Megapascal

mtDNA – *Mitochondrial deoxyribonucleic acid* (Ácido desoxirribonucleico mitocondrial)

NCBI – *National Center for Biotechnology Information* (Centro Nacional de Informação Biotecnológica)

PCR – *Polymerase chain reaction* (Reação em cadeia da polimerase)

PO – *Per os* (por via oral)

P.V. – Peso vivo

RFLP – *Restriction fragment length polymorphism* (Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição)

s.l. – *Sensu lato*

s.s. – *Sensu stricto*

SSCP – *Single stranded conformational polymorphism* (Polimorfismo de conformação de filamento único)

t – Tonelada(s)

UE – União Europeia

UT – Universidade de Tóquio

UV – Ultravioleta

A - Breve descrição das atividades realizadas no período de estágio

Esta dissertação procura relatar o trabalho que foi desenvolvido no decurso do estágio curricular realizado nos termos a que se refere a alínea a) do parágrafo 3º do artigo 6º do Regulamento do Mestrado Integrado em Medicina Veterinária conforme indicado no Anexo II do Despacho reitoral n.º 11281/2013 de 9 de agosto.

O estágio foi composto por duas fases principais: a primeira decorreu no Laboratório de Ictiopatologia (LI), integrante da Graduate School of Agricultural and Life Sciences (GSALS) / Faculty of Agriculture da Universidade de Tóquio (UT), Japão, e a segunda, nos serviços veterinários oficiais – Direção-Geral de Alimentação e Veterinária (DGAV) – que superintendem ao controlo oficial dos produtos da pesca em Portugal, com objetivos distintos mas complementares. No total o estágio curricular teve uma duração aproximada de 888 horas (Tabela1).

Tabela 1. Número de horas de contacto prático.

Entidade	Local	Nº de horas despendidas
LI-UT	Tóquio	432
DGAV	Oeiras	176
	Peniche	72
FMV-UL	Lisboa	208
Total		888

O estágio realizado na Universidade de Tóquio constituiu uma experiência muito enriquecedora. Este local foi escolhido porque o Japão não só figura como um dos países que mais investimento faz no domínio da investigação dos produtos da pesca, como representa também uma realidade completamente diferente. Deste modo, tornou-se possível o desenvolvimento de competências tanto em termos profissionais, devido à grande capacidade técnica a que foi possível aceder, como também pela experiência no plano pessoal, tendo havido a oportunidade de contactar e trabalhar com pessoas de diversas nacionalidades e culturas distintas, tanto dentro como fora da faculdade. Esta experiência teve lugar de 3 de setembro a 15 de novembro do 2013, tendo sido integrado nos trabalhos de um projeto de investigação coordenado pelo Doutor Karl Marx Andaya Quiazon, da Faculdade de Pescas da Central Luzon State University, Filipinas. Este plano de pesquisa foi superiormente tutelado pelo Professor Doutor Tomoyoshi Yoshinaga, responsável académico daquele laboratório. O foco da pesquisa centrou-se na identificação e caracterização de nemátodes do género *Anisakis* da região norte do oceano Pacífico.

As tarefas englobavam o estudo de formas parasitárias adultas obtidas a partir de mamíferos marinhos da costa filipina, nomeadamente indivíduos da espécie *Tursiops*

truncatus (roaz-corvineiro) e *Kogia breviceps* (cachalote-pigmeu), entre outros, assim como exemplares de estados larvares recolhidos de produtos da pesca, maioritariamente provenientes de mercados locais em Tóquio. Entre elas constavam exemplares de espécies muito populares na gastronomia nipónica tais como *Pleurogrammus azonus* (conhecido localmente por “*hokke*”), indivíduos do género *Oncorhynchus* (salmão) e *Thunnus* (atum), entre outros. O primeiro mês de trabalho foi dedicado ao estudo e execução de abordagens moleculares aplicadas na identificação dos parasitas. Para tal realizei necrópsias e procedi à digestão enzimática dos tecidos dos hospedeiros íctios e posterior dissolução química, com recurso a protocolos de extração e purificação de DNA. Fiz a amplificação das regiões de DNA no domínio do espaçador transcrito interno (ITS), citocromo c-oxidase subunidade 1 (*cox1*) e subunidade 2 (*cox2*) através de PCR. Por fim, o DNA purificado foi então submetido à técnica de polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP) e ainda à sequenciação genética, seu processamento e interpretação. Durante este período de tempo aprendi a utilizar diversos tipos de *software* de edição de dados genéticos entre os quais o Clustal™X2.1, BioEdit Sequence Alignment Editor™, MEGA™5.2.2, PAUP™4.0 e NEBcutter™ V2.0, assim como a base de dados online do National Center for Biotechnology Information (NCBI). Através destes instrumentos procedi à escolha de iniciadores ou “*primers*” específicos para cada espécie conhecida de *Anisakis*, e desenhei árvores filogenéticas para comparação e agrupamento de genomas dos parasitas e possível identificação da espécie.

Tive ainda oportunidade de participar numa atividade prática de disseção e observação de outras formas parasitárias em peixe e bivalves, nomeadamente os protozoários *Kudoa septempunctata*, *Perkinsus honshuensis* e *Cryptocaryon irritans*, e visitei igualmente o mercado grossista de Tóquio - Tsukiji (Figura 1). Neste local, considerado o maior mercado de produtos da pesca do mundo e o mais importante do Japão, assisti ao ato de compra e venda (leilão) de atum (*Thunnus* spp.) que tem lugar todas as madrugadas.

Figura 1. Mercado grossista de Tóquio – Tsukiji.



Legenda: A- Avaliação do atum pelos compradores; B- Leilão; C- Banca de peixe (*Trachurus japonicus*).

Durante o segundo mês, além das técnicas bioquímicas e genéticas, foram também recolhidos dados para identificação morfológica. Mais concretamente observei larvas e adultos de *Anisakis* ao microscópio ótico para identificação e medição das estruturas anatómicas internas dos espécimes e captação das respetivas imagens. Entre as estruturas mais importantes podem destacar-se o esófago, o ventrículo, a cauda e as espículas copulatórias, no caso dos machos adultos.

Nas últimas semanas deste estágio foi também posto em prática um protocolo de preparação de amostras para a observação em microscopia eletrónica de varredura (SEM), de modo a completar a caracterização morfológica dos parasitas, tendo tido contacto e praticado as respetivas técnicas. Foram observadas estruturas anatómicas externas, nomeadamente o *mucron*, a cavidade anal, as papilas anais, os lábios e o poro excretor. Duas vezes por semana, tive ainda oportunidade de assistir a seminários sobre doenças de peixes, bivalves e crustáceos e procedi regularmente à análise de artigos científicos sobre o tema. Na última semana passada naquela instituição académica realizei uma breve apresentação para os colaboradores do departamento em que estava inserido (Departamento de Biociência Aquática – UT), versando precisamente o conjunto de atividades desenvolvidas e os conteúdos apreendidos durante o período de estágio.

A segunda fase do trabalho decorreu em Portugal, nos primeiros meses do ano de 2014, na DGAV. Primeiro na Direção de Serviços de Segurança Alimentar (DSSA), em Oeiras, e posteriormente na Direção de Serviços de Alimentação e Veterinária da Região de Lisboa e Vale do Tejo (DSAVRLVT), principalmente na Lota de Peniche, sendo as tarefas ali realizadas complementadas com análises laboratoriais efetuadas na Faculdade de Medicina Veterinária (FMV-UL), nos laboratórios das disciplinas de Inspeção Sanitária e de Parasitologia. Como tal, no mês de janeiro, sob orientação do Dr. Pedro Margarido, contactei de perto com as questões mais técnicas no que diz respeito a segurança dos produtos da pesca, nomeadamente o Plano de Controlo Oficial de Navios (PCON), o Plano Integrado de Controlo Oficial de Pisciculturas (PICOP), o Plano de Aprovação e Controlo de Estabelecimentos (PACE), o Plano de Inspeção dos Géneros Alimentícios (PIGA), assim como da legislação comunitária que regulamenta todo este sector. Durante o mês seguinte o tempo foi repartido entre os serviços oficiais, na região de Peniche, e os laboratórios da FMV-UL. O trabalho consistia em acompanhar as atividades da Dr.^a Ana Barbosa e da Eng.^a Manuela Antunes tanto na lota de Peniche como nas diferentes deslocações para vistoria a estabelecimentos da região (no âmbito do PACE), assim como na recolha de amostras de peixe para analisar posteriormente na FMV-UL.

I. *Anisakis* spp. e os seus hospedeiros

1. Introdução

Dos incontáveis perigos biológicos veiculados pelos produtos da pesca, os parasitas constituem um grupo bastante relevante em saúde pública. Destes, destaca-se a família *Anisakidae*, onde estão incluídos doze géneros diferentes de nemátodes aquáticos: *Anisakis* (Dujardin, 1845), *Contracaecum* (Railliet & Henry, 1912), *Goezia* (Zeder, 1800), *Heterotyphlum* (Spaul, 1927), *Paranisakis* (Baylis, 1923), *Phocascaris* (Höst, 1932), *Pseudoterranova* (Mozgovoi, 1951), *Raphidascaroides* (Yamaguti, 1941), *Raphidascaris* (Railliet & Henry, 1915), *Sulcascaris* (Hartwich, 1957), *Terranova* (Leiper & Atkinson, 1914) e *Hysterothylacium* (Ward & Magath, 1917). Alguns são mais frequentes que outros, no entanto o género *Anisakis* assume claramente uma posição de realce. O interesse e a importância do estudo destes anisacídeos decorrem de uma série de questões muito relevantes em Medicina Veterinária. Em primeiro lugar pelo impacto que estes parasitas internos têm na vida dos animais aquáticos, provocando-lhes doenças que condicionam o seu desenvolvimento e perturbam a sua atividade biológica. O segundo, pelos crescentes impactos negativos que têm sobre a saúde dos humanos que se expõem através do consumo de peixes e cefalópodes crus, e cujas consequências podem ser de bastante gravidade.

Para se perspetivarem adequadamente estes dois ângulos do problema é indispensável caracterizar o ciclo de vida deste parasita e equacionar o conjunto de medidas que são aplicáveis à gestão de risco da anisacídose nos humanos.

1.1. O parasita – *Anisakis* spp.

Os anisacídeos do género *Anisakis* são nemátodes cosmopolitas com um ciclo de vida heteroxeno e indireto que parasitam vertebrados e invertebrados marinhos (Berland, 2006; Mattiucci & Nascetti, 2008; Klimpel & Palm, 2011; Kuhn, Hailer, Palm & Klimpel, 2013). São responsáveis pela anisacídose, uma doença zoonótica que tem vindo a afetar um número crescente de seres humanos (Moneo, Caballero, Rodriguez-Perez, Rodriguez-Mahillo & Gonzalez-Muñoz, 2007; Audicana & Kennedy, 2008; Anshary, Sriwulan, Freeman & Ogawa, 2014), principalmente nos países desenvolvidos (Baird, Gasser, Jabbar & Lopata, 2014), devido à ingestão de produtos da pesca crus ou confeccionados de forma deficiente (Kuhn, García-Marquez & Klimpel, 2011; Quiazon, Santos & Yoshinaga, 2013). *Anisakis simplex* é o mais frequente, sendo reconhecido como o único parasita dos produtos da pesca responsável pelo desencadeamento de situações de alergia no Homem (EFSA, 2010).

1.1.1 Taxonomia e identificação

O género *Anisakis* pertence ao Filo *Nemathelminthes*, Classe *Nematoda*, Ordem *Ascaridida*, Sub-ordem *Ascaridina*, Super-família *Ascaridoidea*, Família *Anisakidae* (Carvalho-Varela, 2005). O seu nome provém do grego, idioma onde “*anisos*” significa desigual e “*akis*” é sinónimo de ponta.

A sua taxonomia tem estado envolta em alguma dúvida e controvérsia ao longo dos tempos (Mattiucci & Nascetti, 2008; Klimpel & Palm, 2011). A classificação inicial foi estabelecida com base em características morfológicas mas, na verdade, o número de acidentes que têm significado taxonómico relevante são diminutos e difíceis de caracterizar (Klimpel & Palm, 2011; Kuhn *et al.*, 2013), para além de serem aplicáveis unicamente a indivíduos adultos e maioritariamente apenas aos machos (Mattiucci & Nascetti, 2008). Existem referências a uma sequência de denominações para este parasita no passado, nomeadamente *Ascaris marina*, *Capsularia marina*, *Anisakis marina* ou ainda *Stomachus marinus* (Moravec, 1994). Berland (1961) refere ainda a utilização dos nomes *Anacanthocheilus rotundatus* e *Agamascaris septentrionalis* como sinónimos do género *Anisakis*. Nas últimas décadas o recurso a técnicas bioquímicas e marcadores genéticos permitiu a utilização de metodologias mais objetivas capazes de discriminar mais finamente várias espécies dentro deste género (D’Amelio *et al.*, 2000; Mattiucci *et al.*, 2005; Berland, 2006; Mattiucci & Nascetti, 2008; Mattiucci, Paoletti & Webb, 2009). Neste novo processo de especiação recorreu-se inicialmente ao uso de aloenzimas, nomeadamente a técnica MEE (eletroforese de enzimas multilocular), também designada de MAE (eletroforese de aloenzimas multilocular) (Mattiucci & Nascetti, 2008; Mattiucci *et al.*, 2009; Kuhn *et al.*, 2013), o que tornou possível reconhecer três espécies diferentes, até ao início da década de 1980: *A. simplex*, *A. typica* e *A. physeteris* (Quiazon, Yoshinaga, Ogawa & Yukami, 2008). As metodologias moleculares genéticas surgiram posteriormente, sendo a PCR-RFLP (reação em cadeia da polimerase – polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição) a que é mais vulgarmente usada na atualidade (D’Amelio *et al.*, 2000; Mattiucci & Nascetti, 2008; Murata, Suzuki, Sadamazu & Kai, 2011; Zhang, Du, An, Li & Glasser, 2013; Baird *et al.*, 2014). Também têm sido usados outros métodos baseados na PCR, como a técnica SSCP (polimorfismo de conformação de filamento único) (Mattiucci & Nascetti, 2008; Kuhn *et al.*, 2013) e a sequenciação genética (Mattiucci & Nascetti, 2008; Klimpel & Palm, 2011; Murata *et al.*, 2011; Baird *et al.*, 2014). Estas técnicas aplicam-se tanto ao DNA nuclear a nível da ITS (ITS-1 e ITS-2) como do DNA mitocondrial das duas subunidades da citocromo c-oxidase (*cox1* e *cox2*) (D’Amelio *et al.*, 2000; Mattiucci & Nascetti, 2008; Klimpel & Palm, 2011; Murata *et al.*, 2011; Baird *et al.*, 2014). Uma das maiores vantagens dos métodos genéticos, quando comparados com a utilização das aloenzimas é a possibilidade de se poder efetuar a identificação individual específica partindo quer de amostras frescas, quer congeladas ou fixadas em etanol (Baird *et al.*, 2014), apesar da utilização das aloenzimas

ser geralmente mais célere (Mattiucci & Nascetti, 2008). Estas técnicas moleculares tornaram possível verificar que aquilo que inicialmente se pensava ser uma única espécie (*sensu lato*) corresponde na realidade a espécies distintas. Ou seja, os complexos de espécies ou morfoespécies compreendem, na realidade, várias espécies gêmeas ou “*sibling species*” (D’Amelio *et al.*, 2000; Mattiucci *et al.*, 2005; Mattiucci & Nascetti, 2008; Quiazon *et al.*, 2008). Quando se percebeu que a espécie inicialmente designada *Anisakis simplex* eram afinal três diferentes, estabeleceu-se uma nova nomenclatura, respetivamente, *A. simplex* A, *A. simplex* B e *A. simplex* C. As duas primeiras espécies viram a sua designação ser alterada, nas últimas décadas, para *A. pegreffii* e *A. simplex sensu stricto*, respetivamente (Mattiucci *et al.*, 2008). A terceira manteve a sua denominação secundária até 2014, altura em que Mattiucci *et al.* (2014) a caracterizaram convenientemente e propuseram o nome *Anisakis berlandi*. Este nome será doravante utilizado nesta revisão em substituição, embora como sinónimo, de *A. simplex* C, ainda empregue à data desta redação.

Deste modo, na atualidade são cientificamente reconhecidas 9 espécies do género *Anisakis*: *A. simplex* (s.s.), *A. pegreffii*, *A. berlandi* (que constituem o complexo *Anisakis simplex*), *A. ziphidarum*, *A. typica*, *A. nascettii*, *A. physeteris*, *A. brevispiculata* e *A. paggiae* (estas últimas três integram o complexo *Anisakis physeteris*) (Mattiucci *et al.*, 2009; Karl, Baumann, Ostermeyer, Kuhn & Klimpel, 2011; Klimpel, Kuhn, Busch, Karl & Palm, 2011; Klimpel & Palm, 2011; Murata *et al.*, 2011; Kuhn *et al.*, 2013; Quiazon, Santos & Yoshinaga, 2013). Foram igualmente descritos indivíduos híbridos de *A. simplex* (s.s.) e *A. pegreffii* nomeadamente em águas japonesas (Quiazon, Yoshinaga & Ogawa, 2011a) e portuguesas (Hermida *et al.*, 2012). De facto, em território português já foi notificada a presença de todas as espécies com exceção de *A. berlandi* e *A. paggiae*, sendo a zona oceânica envolvente do arquipélago da Madeira particularmente rica em biodiversidade destes nemátodes (Hermida *et al.*, 2012).

A questão da discriminação das espécies de *Anisakis* começou a ser equacionada no início da década de 60 do século XX. Em 1961, Berland propôs a classificação das larvas de *Anisakis* em 2 tipos consoante a dimensão do ventrículo, o tipo de transição entre este e o intestino e a presença ou ausência de espinha caudal ou *mucron*. Sabe-se atualmente que as larvas do tipo I (*sensu* Berland, 1961) pertencem às espécies *A. simplex* (s.s.), *A. pegreffii*, *A. berlandi*, *A. typica*, *A. ziphidarum* e *A. nascettii*, enquanto as espécies *A. physeteris*, *A. brevispiculata* e *A. paggiae* apresentam larvas do tipo II (*sensu* Berland, 1961) (Mattiucci *et al.*, 2009; Kuhn *et al.*, 2011; Murata *et al.*, 2011; Kuhn *et al.*, 2013; Anshary *et al.*, 2014). Como tal, é prática comum, atualmente, dividir-se as espécies em dois grupos consoante o seu tipo larvar, conforme sugerido por Berland nos anos 60. As espécies de cada grupo são morfológica e geneticamente semelhantes entre si (Mattiucci & Nascetti,

2008; Baird *et al.*, 2014). A distribuição geográfica assim como os hospedeiros típicos destes parasitas marinhos parecem ter alguma especificidade (Tabela 2).

Tabela 2. Repartição geográfica e zoológica das diferentes espécies de *Anisakis*.

Espécie	Classificação larvar (<i>sensu</i> Berland, 1961)	Habitat preferencial dos hospedeiros teleósteos	Hospedeiros definitivos típicos (famílias)	Distribuição geográfica
<i>A. simplex</i> (s.s.)	Tipo I	Bento-pelágico	<i>Balaenopteridae</i> , <i>Delphinidae</i> , <i>Monodontidae</i> e <i>Phocoenidae</i>	Atlântico e Pacífico norte incluindo limites árticos
<i>A. pegreffii</i>	Tipo I	Bento-pelágico	<i>Delphinidae</i> e <i>Neobalaenidae</i>	Mediterrâneo, Atlântico e Pacífico
<i>A. berlandi</i>	Tipo I	Bento-pelágico	<i>Delphinidae</i>	Pacífico
<i>A. typica</i>	Tipo I	Pelágico	<i>Delphinidae</i> , <i>Phocoenidae</i> e <i>Pontoporidae</i>	Atlântico, Pacífico e Índico tropicais
<i>A. ziphidarum</i>	Tipo I	Demersal e Pelágico	<i>Ziphiidae</i>	Atlântico norte e Pacífico sul
<i>A. nascettii</i>	Tipo I	Pelágico	<i>Ziphiidae</i>	Atlântico norte e Pacífico sul
<i>A. physeteris</i>	Tipo II	Demersal	<i>Physeteridae</i>	Atlântico norte e Mediterrâneo
<i>A. brevispiculata</i>	Tipo II	Demersal	<i>Kogiidae</i>	Atlântico norte
<i>A. paggiae</i>	Tipo II	Pelágico	<i>Kogiidae</i>	Atlântico norte

Adaptado de Mattiucci *et al.* (2001), Mattiucci e Nascetti (2008), Quiazon *et al.* (2008), Mattiucci *et al.* (2009), Kuhn *et al.* (2013), Quiazon *et al.* (2013) e Mattiucci *et al.* (2014).

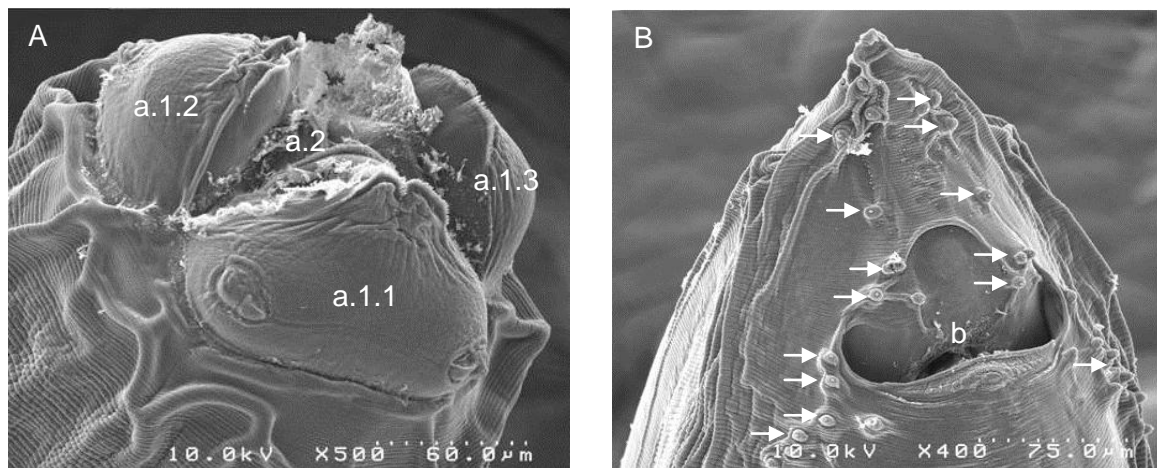
1.1.2. Morfologia

Tal como o próprio nome da classe sugere, estes parasitas são caracterizados por apresentarem um corpo longo e esguio, lembrando um fio (“*Nema*” em grego). A cutícula externa dá-lhe rigidez, e juntamente com a musculatura, forma um tubo que encerra um trato digestivo centralizado que corre ao longo de praticamente toda a extensão do corpo. O sistema digestivo é completo, começando na boca e terminando no ânus após o intestino (Berland, 2006).

Tal como citado por Mattiucci e Nascetti (2008), o adulto do género *Anisakis* é caracterizado por apresentar, na região anterior, 3 lábios, um dorsal e dois ventro-laterais, cada um com uma projeção anterior bilobada mas sem interlabia (Figura 2-A). Possui uma glândula excretória bem desenvolvida drenada por um ducto que conflui num poro localizado entre os lábios ventro-laterais. O esófago muscular longo (também designado proventrículo) une a boca ao ventrículo glandular (Berland, 2006). Este último é mais comprido que largo e frequentemente de forma sigmóide nas espécies do tipo I (*sensu* Berland, 1961) e pequeno, nunca sigmóide, por vezes em forma de violino e mais largo que comprido nas do tipo II (*sensu* Berland, 1961) (Mattiucci *et al.*, 2005; Mattiucci & Nascetti, 2008). O ventrículo situa-se em contiguidade com a região anterior da glândula excretória, que se continua posteriormente com o intestino (Silva, 2002). Fêmeas e machos possuem sexos separados (Berland, 2006). Nas primeiras, a vulva localiza-se a meio ou no primeiro terço do corpo. Nos segundos, as espículas copulatórias são geralmente longas e desiguais no comprimento nas espécies do tipo I (exceto em *A. ziphidarum* em que são iguais) e curtas, robustas e de tamanho mais aproximado nas do segundo tipo (Mattiucci & Nascetti, 2008). Naquelas em que as espículas são diferentes, a direita é a mais curta (Mattiucci *et al.*, 2009). Na porção posterior dos machos existe um conjunto de papilas sensitivas pré e pós-anais localizadas na face ventral, próximas da extremidade da cauda (Mattiucci & Nascetti, 2008), que auxiliam na cópula (Berland, 2006) (Figura 2-B). A disposição destes órgãos na região pós-anal é taxonomicamente relevante (Berland, 2006; Quiazon *et al.*, 2008). De acordo com as observações de Ugland, Strømnes, Berland e Aspholn (2004) e Berland (2006), as dimensões do adulto são proporcionais ao tamanho do respetivo hospedeiro. Como tal, numa toninha-comum (*Phocaena phocaena*) este nemátode atinge, em média, 6-7 cm enquanto na muito mais volumosa baleia-de-minke (*Balaenoptera acutorostrata*) o seu comprimento aproxima-se geralmente dos 13 cm, podendo este valor alcançar o dobro. As dimensões da fêmea são consideravelmente superiores às do macho (Ugland *et al.*, 2004). Também nos estádios larvares parece existir uma correlação entre as dimensões da larva e as do respetivo hospedeiro teleósteo (Berland, 2006). As larvas L3 apresentam apenas alguns milímetros, geralmente entre 10 e 36 (Carvalho-Varela, 2005). A sua cor é branca, leitosa ou translúcida e tem estrias cuticulares transversas marcadas (Carvalho-Varela, 2005) que as permitem distinguir das larvas amarelas ou acastanhadas do género *Pseudoterranova* (Hochberg & Hamer, 2010) e das irregulares de *Contracaecum* (Berland, 2006). No terceiro estágio larvar, os parasitas deste género ainda não possuem lábios desenvolvidos mas, ventralmente à boca, estão munidos de um dente larvar (Berland, 2006), de forma triangular, dirigido exteriormente (Raamat, 2012) (Figura 3). Segundo Berland (2006), este dente saliente terá como função perfurar os tecidos do hospedeiro. As larvas do tipo I (*sensu* Berland, 1961) possuem um ventrículo longo, a transição entre este e o intestino é oblíqua e ainda uma espinha caudal ou *mucron* no extremo posterior do corpo

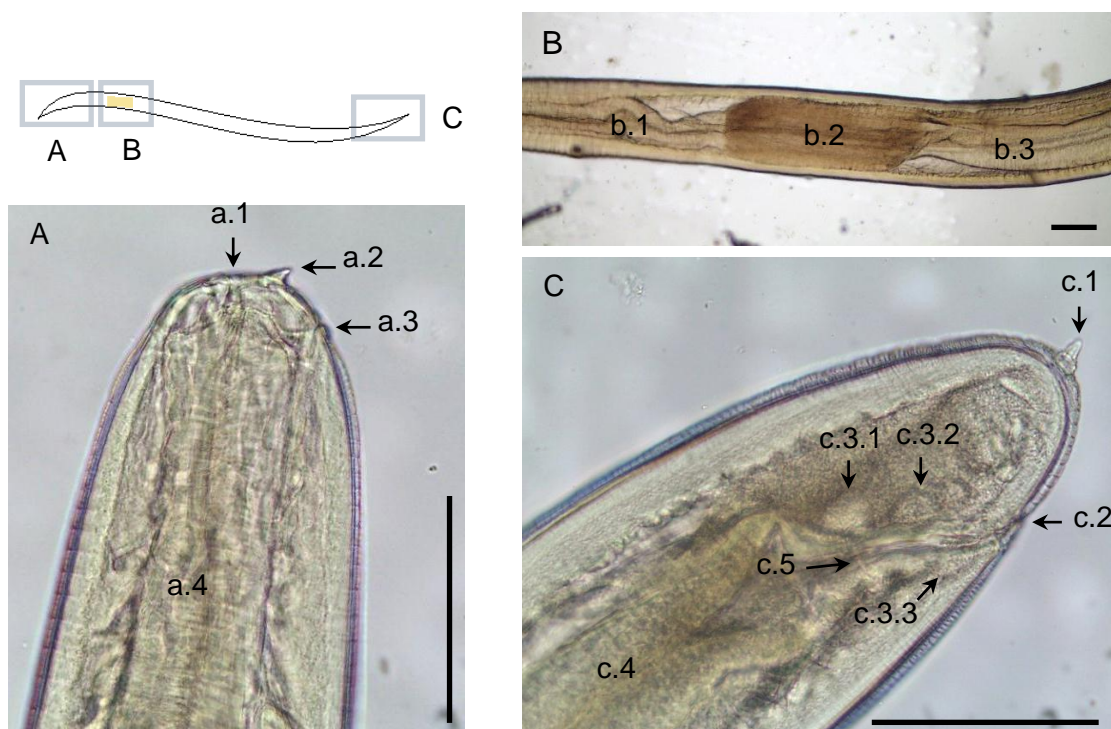
que as permite distinguir das do tipo II (*sensu* Berland, 1961), cujo ventrículo é mais curto, apresentam uma transição ventrículo-intestinal direita e o *mucron* está ausente (Quiazon *et al.*, 2009).

Figura 2. Aspectos gerais da morfologia externa do adulto de *Anisakis* spp.



Legenda: A- porção anterior; a.1.1, a.1.2, a.1.3- lábios; a.2- boca; B- Porção posterior; b- ânus; setas- papilas sensitivas. Nota: Indivíduo macho.

Figura 3. Aspectos gerais da morfologia da larva L3 de *Anisakis* spp.



Legenda: A - porção anterior: a.1- boca; a.2- dente larvar; a.3- poro excretor; a.4- esôfago. B- porção média: b.1- esôfago; b.2- ventrículo; b.3- intestino. C- porção posterior: c.1- espinha caudal ou *mucron*; c.2- ânus; c.3.1, c.3.2 e c.3.3- glândulas rectais; c.4- intestino terminal; c.5- canal rectal. Nota: Larva tipo I (*sensu* Berland, 1961). (Barra escala - 160 µm).

O género *Anisakis* nunca apresenta apêndice ventricular nem ceco intestinal, em qualquer fase da sua vida, traço que o diferencia do género *Contracaecum* – que possui ambos – e

do género *Pseudoterranova* – que apenas está dotado do segundo (Mattiucci & Nascetti, 2008). Tem um anel nervoso na região anterior e a sua cauda é geralmente cónica (Carvalho-Varela, 2005). No estágio L3, logo após o anel nervoso existem duas saliências, diametralmente opostas, designadas de derídeos (Ventura, 2006), que envolvem quando mudam para L4. Nessa altura perdem também o dente larvar, os lábios desenvolvem-se (Berland, 2006) e, aquelas que o tinham, abdicam do *mucron* (Quiazon *et al.*, 2008).

1.1.3. Ciclo biológico

Cada espécie de *Anisakis* tem ciclos de vida e distribuições zoogeográficas distintas associados a hospedeiros preferenciais mas que ainda não estão totalmente elucidados (Klimpel *et al.*, 2011; Kuhn *et al.*, 2013; Quiazon *et al.*, 2013). O ciclo de vida destes parasitas é complexo e compreende cinco estádios separados por quatro mudas (Ugland *et al.*, 2004; Klimpel & Palm, 2011). O adulto encontra o seu biótopo no estômago de mamíferos marinhos, principalmente cetáceos mas também já foi identificado em pinípedes (Berland, 2006). Os ovos são eliminados através das fezes do hospedeiro definitivo (HD) para o ambiente aquático e apenas quando abandonam o corpo e chegam à coluna de água se dá o desenvolvimento embrionário (Berland, 2006; Klimpel & Palm, 2011). Não existe ainda consenso entre os vários autores quanto à fase seguinte. Oshima (1972) afirma que a larva no primeiro estágio (L1) se desenvolve e passa a L2, no momento em que eclode. Uma vez livre no meio, a larva é ingerida por crustáceos, hospedeiros intermediários (HI), nos quais muda para o terceiro estágio (L3) e se aloja no hemocélio depois de transpor o intestino (Klimpel & Palm, 2011). Por seu turno, Køie, Berland e Burt (1995) afirmam que o estágio que eclode do ovo é já o L3 e é esta a forma infetante para os pequenos crustáceos. Independentemente disso parece ser globalmente aceite que a larva eclode apenas quando a temperatura da água é baixa, a salinidade elevada e há presença de oxigénio (Ugland *et al.*, 2004). Estes microcrustáceos da família *Euphausiidae*, popularmente conhecidos por *krill*, são alvo de predação por peixes e cefalópodes que atuam como hospedeiros paraténicos (HP) ou de transporte (HT), pois alojam a larva nos seus órgãos e tecidos, onde podem aumentar de tamanho, sem que ocorra qualquer muda (Quiazon *et al.*, 2013; Baird *et al.*, 2014).

Reconhecem-se atualmente, pelo menos, 155 espécies de peixes teleósteos pertencentes a 19 ordens e 71 famílias que podem funcionar como hospedeiros paraténicos de *Anisakis*. A ordem dos perciformes (57 espécies) e a família *Scombridae* (12 espécies) são as mais representadas. A pescada-do-Atlântico (*Merluccius merluccius*) já foi descrita como hospedeiro de 8 das espécies de *Anisakis* (Kuhn *et al.*, 2013). Os teleósteos piscívoros no topo da cadeia alimentar dão abrigo, naturalmente, a maior número de larvas, pois os parasitas vão-se acumulando ao longo dos níveis tróficos (Hochberg & Hamer, 2010; Kuhn *et al.*, 2013). É importante frisar que, do ponto de vista sanitário e epidemiológico, este facto

é relevante pois certos peixes podem acumular milhares de larvas e teoricamente representar, por isso, maior risco que outros (EFSA, 2010). Note-se que, apesar de a maioria dos peixes hospedeiros serem marinhos, também existem espécies de água-doce que podem ser infetadas. Estas são sempre migratórias, na sua maioria salmonídeos que se infetam durante a fase de vida marinha. No caso da aquacultura marinha (armações flutuantes), os salmões e trutas, infetam-se quando ingerem peixes selvagens infetados ou por intermédio de invertebrados contaminados que frequentem as suas jaulas (Carvalho-Varela, 2005). Estudos citados por Noguera *et al.* (2009) sugerem que a localização larvar poderá depender do regime alimentar do peixe, visto que as espécies que se alimentam diretamente de microcrustáceos apresentam o parasita tendencialmente concentrado na cavidade abdominal enquanto nos hospedeiros piscívoros esta distribuição é dispersa nos vários tecidos. A larva L3 pode permanecer no hospedeiro teleósteo indefinidamente, mantendo a sua capacidade infetante mesmo depois de um longo período (Petrie, Wootten, Bruno, MacKenzie & Bron, 2007). Além dos peixes teleósteos e cefalópodes, também nos elasmobrânquios existem relatos de parasitismo deste nemátode (Knoff, de São Clemente, Pinto & Gomes, 2001) além de que foi recentemente descrita a lampreia-marinha (*Petromyzon marinus*) igualmente como hospedeiro de *Anisakis* (Bao, Garci, Antonio & Pascual, 2013), o que evidencia mais vincadamente a versatilidade e a onnipresença deste género parasitário (Baird *et al.*, 2014). Posteriormente, os peixes e cefalópodes podem então ser predados pelos mamíferos marinhos (HD) e já no seu estômago a larva atinge o quarto estágio (L4) e seguidamente o parasita torna-se adulto (Ugland *et al.*, 2004; Hochberg & Hamer, 2010; Baird *et al.*, 2014). No caso de algumas baleias, a infeção poderá ocorrer pela ingestão direta de *krill* parasitado (Ugland *et al.*, 2004; Kuhn *et al.*, 2013). O objetivo reprodutivo de *Anisakis* é atingido quando a fêmea, depois de aumentar a sua dimensão corporal, se torna sexualmente madura, executa a cópula e deposita os ovos – cerca de 1 000 000 – num curto período de tempo – 85% nos primeiros 3 dias – antes de morrer (Ugland *et al.*, 2004). O seu cadáver é expulso como consequência do peristaltismo intestinal do hospedeiro juntamente com as fezes e os seus ovos (Ugland *et al.*, 2004). Estes eventos têm uma duração curta. A permanência da fêmea no estômago do hospedeiro definitivo não ultrapassa geralmente os 2 a 3 meses (Ugland *et al.*, 2004; Berland, 2006). De acordo com estudos efetuados por Ugland *et al.* (2004), o facto de a proporção de fêmeas ser superior à de machos, no estômago dos cetáceos, sugere que estes vivem menos tempo que aquelas, morrendo possivelmente logo após a cópula.

O Homem é um hospedeiro accidental (HA) no ciclo de vida do género *Anisakis* quando ingere peixes ou cefalópodes crus ou insuficientemente confeccionados que se encontram parasitados por formas infetantes L3 (Cruz, Vaz & Saraiva, 2005; Audicana & Kennedy, 2008; Herrero, Vieites & Espiñeira, 2011; Quiazon *et al.*, 2013; Baird *et al.*, 2014). Neste “hospedeiro de fundo de saco”, a larva raramente se desenvolve até adulto e acaba quase

sempre por ser eliminada pelo sistema imunitário em pouco tempo (Audicana & Kennedy, 2008; Hochberg & Hamer, 2010). Por outro lado, também o gato doméstico foi descrito como hospedeiro acidental deste parasita (Huh, Sohn & Chai, 1993), por isso, além de representar uma causa possível de doença gastrointestinal neste animal, esta pode ainda ser uma fonte hipotética de infecção alternativa, por via alimentar, para o próprio Homem em determinadas partes do mundo.

1.1.4. Patogenia

Desde 1988 que são utilizados termos distintos no que concerne a nomenclatura internacional dos estados mórbidos causados por *Anisakis* (Audicana & Kennedy, 2008; Klimpel & Palm, 2011): a anisaquidose (“*anisakidosis*”) (Mattiucci & Nascetti, 2008) diz respeito a qualquer forma de doença causada indistintamente por um nemátode da família *Anisakidae* (membros dos géneros *Anisakis*, *Pseudoterranova*, *Contracaecum*, por exemplo) enquanto a designação anisaquiose (“*anisakiasis*” ou “*anisakiosis*”) designa a parasitose originada especificamente por membros do género *Anisakis* (Kuhn *et al.*, 2011). Similarmente, quando na origem da afeção está o género *Pseudoterranova*, é aplicado o termo pseudoterranovose (Hochberg & Hamer, 2010).

1.1.4.1. No hospedeiro íctio (HP)

Uma vez ingeridas pelo peixe, as larvas (L3) tornam-se livres no lúmen digestivo, nomeadamente a nível do estômago, cecos pilóricos e intestino (Quiazon, Yoshinaga & Ogawa, 2011b). Quando o parasita migra para fora do tubo digestivo, perfurando as paredes dos órgãos com o seu dente larvar e utilizando excreções, o sistema imunitário do peixe encara a larva como um corpo estranho e esta é encapsulada (Berland, 2006). Dentro dessa cápsula que mede, em média, 4 a 5 mm em secção, a larva apresenta-se espiralada (EFSA, 2010). A resposta imunitária envolve a produção de anticorpos específicos contra o parasita, contudo, apesar de encapsulado, o nemátode permanece viável (Molnár, Buchmann & Székely, 2006). Quanto mais avançada for a idade do hospedeiro, e mais adaptado o seu sistema imunitário, maior é a probabilidade de ocorrer encapsulamento (Berland, 2006). Por outro lado, segundo Cruz (1988), os helmintes do género *Anisakis* poderão ser responsáveis por uma diminuição na resposta imunitária em robalo-muge (*Morone saxatilis*), baixando o título de anticorpos no sangue, provocando igualmente um decréscimo do hematócrito. Os tecidos nos quais as larvas já foram detetadas incluem o fígado, os rins, as gónadas, a gordura e o peritонеu (Borges, 2008). Além dos órgãos, é frequente as larvas (L3) surgirem no músculo do peixe, principalmente a nível da musculatura hipaxial que recobre a cavidade abdominal, na região das abas abdominais ou “*belly flaps*” (Ugland *et al.*, 2004; Berland, 2006; Llarena-Reino *et al.*, 2012), mas algumas larvas podem também ser encontradas nos músculos dorsais do hospedeiro (EFSA, 2010). Os diferentes autores não são unânimes

quando o assunto é a migração larvar para o músculo (EFSA, 2010; Karl *et al.*, 2011) uma vez que apresentam conclusões contraditórias quanto ao facto de esta se dar *ante* ou *post mortem*. Um parecer da EFSA (2010) sublinha, nesse aspeto, a incerteza quanto às condições e em que espécies de peixe essa migração ocorre. Contudo, nos seus trabalhos em salmonídeos, Karl *et al.* (2011) concluíram que, nestas espécies, não há tendência para migração *post mortem* independentemente das condições de armazenamento subsequentes. Propondo então que esta deslocação parasitária ocorre em vida, logo após a infeção por via alimentar ou em fases biológicas anteriores do hospedeiro.

A intensidade da infeção muscular dos salmonídeos por *A. simplex* (s.s.) é muito superior à de outras (Noguera *et al.*, 2009), sendo esta espécie parasitária geralmente muito mais ativa na migração muscular que a espécie *A. pegreffii* (Quiazon *et al.*, 2011a; Quiazon *et al.*, 2011b; Romero, Valero, Navarro-Moll & Martín-Sánchez, 2013). Também em espécies como o carapau (*Trachurus trachurus*) e a sarda (*Scomber Scombrus*) foi constatado experimentalmente que a migração ocorre na maioria dos indivíduos analisados, tal como é descrito por Silva e Eiras (2003) nos seus trabalhos na costa portuguesa. Apesar de não ser claro se ocorre *ante* ou *post mortem*, estes autores concluem que, para além do conteúdo lipídico do músculo, poderão existir outros fatores que influenciem essa migração parasitária.

A ação patogénica destes nemátodes nos peixes deriva das migrações que executam e do facto de se alimentarem dos tecidos e fluidos orgânicos do mesmo (Berland, 2006; Molnár *et al.*, 2006). Apesar de, por norma, as grandes cargas parasitárias não estarem associadas a alterações externas dos peixes seus hospedeiros, internamente foram já descritas situações de compressão mecânica e necrose do fígado, fibrose, encapsulação hepática, lesões na parede intestinal e ulcerações, emaciação e até mesmo morte (Carvalho-Varela, 2005; Klimpel & Palm, 2011). No exame histológico de músculo infetado, Quiazon *et al.* (2011b) observaram infiltrados de leucócitos e fibras musculares dilaceradas envolvendo a larva. No fígado, Molnár *et al.* (2006) descreveram como achados a rutura de vasos sanguíneos, formação de trombos e, em torno da larva, infiltrados de fibrina, leucócitos e tecido conjuntivo capsular. Parece haver uma ligação, ainda que não inteiramente escrutinada, entre a infeção por *Anisakis simplex* (s.s.) e a doença dos salmonídeos conhecida por síndrome do ventre rubro ou “*Red Vent Syndrome*” (RVS), na qual os peixes que apresentam os sinais hemorrágicos característicos a nível genital se encontram concomitantemente parasitados nessa região (Noguera *et al.*, 2009). Pode ainda haver a possibilidade de transmissão de vírus e bactérias e de infeções secundárias ao parasitismo por organismos oportunistas como os fungos (Silva, 2002). No caso dos peixes elasmobrânquios, como é o caso dos tubarões, a infeção além de ocorrer no estômago é também frequente, mais posteriormente, a nível da válvula espiral (Knoff *et al.*, 2001).

O tratamento desta parasitose nos peixes não parece ser fácil, visto que antihelmínticos como o flubendazole ou parbendazole se mostraram ineficazes no passado. No entanto, visto que o pirantel e o levamisol são nematicidas reconhecidos nos mamíferos, podem ser substâncias com potencial a ponderar também nos peixes (Molnár *et al.*, 2006). Carvalho-Varela (2005) aconselha ainda a administração através da ração de sulfato de piperazina (10 mg/kg P.V./dia durante 3 dias) ou tiabendazol (66 mg/kg P.V. em duas vezes com 20 dias de intervalo), e adverte que as ivermectinas em doses terapêuticas são icticidas.

1.1.4.2. No hospedeiro cetáceo (HD)

O estômago dos cetáceos é composto por 3 secções, a primeira é uma antecâmara ampular não glandular, com um epitélio estratificado queratinizado em tudo semelhante ao primeiro compartimento gástrico dos ruminantes, seguido da porção gástrica propriamente dita e da câmara pilórica posteriormente, ambas possuindo glândulas (Shimokawa *et al.*, 2012). Os indivíduos adultos do género *Anisakis* localizam-se mais frequentemente no primeiro compartimento, associados a alterações patológicas, mas também no segundo (Lehner, Raga & Siebert, 2005). Geralmente, corpos estranhos volumosos não transitam facilmente entre a primeira secção e a segunda, visto o acesso ser estreito (Eo, Yeo & Kwon, 2012). O facto de o parasita adulto se alimentar da ingesta digerida presente no estômago do hospedeiro definitivo e não diretamente do seu sangue ou tecidos (Berland, 2006) pode, em parte, explicar que infeções ligeiras a moderadas raramente causem sinais clínicos nos cetáceos (Dailey, 2001). Os anisquídeos podem ser responsáveis por gastrites e úlceras apenas quando presentes em grande número (Dailey, 2001; Klimpel & Palm, 2011) e geralmente só em infeções severas se pode observar diarreia, desidratação e anemia (Klimpel & Palm, 2011). O diagnóstico pode ser efetuado por endoscopia em animais treinados (Eo *et al.*, 2012) ou pela pesquisa de ovos ou adultos nas fezes (Dailey, 2001). Em pequenos cetáceos em cativeiro o tratamento é conseguido através de fenbendazole (11 mg/kg PO) ou ivermectina (200 µg/kg PO), sendo o primeiro preferível uma vez que o segundo foi associado a sintomatologia nervosa concomitante (Dailey, 2001).

1.1.4.3. No Homem (HA)

Algumas espécies de *Pseudoterranova* ou *Contracaecum* são zoonóticas ou potencialmente zoonóticas mas o género *Anisakis* é considerado o mais importante no que concerne a infeção humana (Mattiucci & Nascetti, 2008; Hochberg & Hamer, 2010). Todavia, nem todas as espécies de *Anisakis* representam perigo para o Homem (Kuhn *et al.*, 2013). Este risco está associado principalmente ao complexo *Anisakis simplex* (Audicana, Ansotegui, Fernández de Corres e Kennedy, 2002; Baird *et al.*, 2014), ainda que existam relatos pontuais de infeções humanas devidas a *A. physeteris* (Hochberg & Hamer, 2010; Kuhn *et al.*, 2011). É, contudo, globalmente reconhecido que a espécie *A. simplex* (s.s.) é a

responsável pela esmagadora maioria dos casos de infeções no Homem (Klimpel & Palm, 2011). Este facto é explicado, em parte, pelos resultados dos trabalhos de Romero *et al.* (2013), que demonstraram que a capacidade infetante de *A. simplex* (s.s.) é 65% superior à de *A. pegreffii* em modelos murinos. Segundo Anshary *et al.* (2014), a espécie *A. typica*, apesar de ainda não ter sido associada a casos de anisakiase, tem o potencial para infetar humanos visto que também atinge o músculo do peixe. Depois de inúmeros estudos sobre o tema, concluiu-se que as alterações patológicas decorrentes da infeção humana por *Anisakis* são o resultado combinado da ação direta da penetração larvar durante a invasão dos tecidos e a interação complexa do sistema imunitário do hospedeiro com as substâncias integrantes ou excretadas pelo parasita (Audicana & Kennedy, 2008; Klimpel & Palm, 2011). Depois de ingerida, e à semelhança do que ocorre no hospedeiro paraténico íctio, a larva invade a mucosa gástrica através da ação mecânica do seu dente larvar e da secreção de potentes enzimas proteolíticas – segregadas na glândula excretória e no esófago – que degradam a matriz extracelular (Audicana & Kennedy, 2008). De facto, a infeção por *Anisakis* despoleta uma resposta imunitária tanto do tipo Th1 (imunidade celular) como do tipo Th2 (imunidade humoral) (Klimpel & Palm, 2011), mas pode afirmar-se que o segundo é predominante nestas situações (Nieuwenhuizen *et al.*, 2006; Audicana & Kennedy, 2008; Baird *et al.*, 2014). Desta resulta a produção de anticorpos específicos (principalmente IgE), recrutamento de eosinófilos, mastócitos e basófilos (Audicana & Kennedy, 2008), hiperplasia das células caliciformes assim como a contração do músculo liso e derrame de fluido vascular. A associação destes eventos culmina geralmente na expulsão do parasita (Baird *et al.*, 2014). Com efeito, a anisakiase pode manifestar-se sob quatro formas clínicas: gástrica, intestinal, ectópica e alérgica (Tabela 3). As primeiras são resultado direto da penetração larvar e a última é a consequência da interação desta com o sistema imunitário do hospedeiro (Audicana & Kennedy, 2008; Hochberg & Hamer, 2010; Baird *et al.*, 2014).

Tabela 3. Apresentações clínicas da anisakiase.

Forma clínica	Sintomatologia	Início dos sintomas	Tipo de tratamento
Gástrica	Dor abdominal intensa, náusea, vômito e por vezes febre	1-12 horas*	- Remoção endoscópica ou cirúrgica
Intestinal	Dor abdominal constante ou intermitente, diarreia	1-7 dias*	- Remoção cirúrgica - Abordagem terapêutica
Ectópica	Depende do tecido infetado	Variável	- Remoção cirúrgica - Abordagem terapêutica
Alérgica	Urticária, angioedema, rinite, broncoconstrição, anafilaxia	Geralmente <5 horas*	- Abordagem terapêutica

*Após refeição infetada. Adaptado de Hochberg e Hamer (2010), Baird *et al.* (2014) e Shrestha *et al.* (2014).

Na forma gástrica o paciente apresenta geralmente dor abdominal intensa, náusea, vômito e por vezes febre (Kuhn *et al.*, 2011; Baird *et al.*, 2014). O início da sintomatologia é abrupto (1-12 horas após a ingestão) e dura geralmente alguns dias. Também foram descritas implicações esofágicas nesta forma da doença (Hochberg & Hamer, 2010). A endoscopia pode evidenciar eritema, edema, gastrite erosiva severa, nódulos e ulcerações (Hochberg & Hamer, 2010). Note-se que estas lesões hemorrágicas e erosivas podem ser explicadas, parcialmente, pela ação anticoagulante dos produtos de excreção/secreção parasitária (E/S) (Audicana & Kennedy, 2008). Na biopsia torna-se clara a presença de um característico infiltrado de células eosinofílicas – granuloma eosinofílico – na mucosa e submucosa e é comum o paciente apresentar leucocitose com eosinofilia nos resultados hematológicos (Audicana & Kennedy, 2008; Hochberg & Hamer, 2010). É a forma clínica da afeção predominante no Japão (Audicana *et al.*, 2002; Hochberg & Hamer, 2010), representando 95,6% dos casos conhecidos (Shrestha *et al.*, 2014). A esmagadora maioria das ocorrências são causadas por uma única larva. Quando à invasão parasitária da mucosa gástrica pelo parasita está associada a alergia estamos perante uma situação conhecida por anisaquiose gastroalérgica (Moneo *et al.*, 2005; Audicana & Kennedy, 2008).

A forma intestinal caracteriza-se por dor abdominal constante ou intermitente, um a sete dias depois do consumo de peixe ou cefalópodes infetados, podendo estar associadas situações de peritonite e/ou ascite (Hochberg & Hamer, 2010; Baird *et al.*, 2014; Shrestha, 2014). Pode ainda ocorrer diarreia (Audicana & Kennedy, 2008). A zona mais afetada é o íleo terminal mas também é possível o envolvimento do cólon e do jejuno (Hochberg & Hamer, 2010). As complicações descritas para esta forma da doença, apesar de raras, incluem estenose ileal, invaginação, perfuração ou obstrução intestinal e pneumoperitонеu (Hochberg & Hamer, 2010). É a forma clínica mais comum na Europa (Audicana *et al.*, 2002; Hochberg & Hamer, 2010).

Quando o parasita perfura e migra para fora do tubo digestivo, diz-se que a parasitose é do tipo ectópico, extra-gastrointestinal ou intraperitoneal (Hochberg & Hamer, 2010; Baird *et al.*, 2014). Já foram encontradas larvas na cavidade pleural, mesentério, fígado, pâncreas, ovário e tecido subcutâneo, mas é considerado o mais raro de todos os tipos de anisaquiose no Homem (Hochberg & Hamer, 2010).

O diagnóstico diferencial de anisaquiose deve ser equacionado quando há história recente de consumo de pescado cru ou insuficientemente confeccionado, seguido de dor abdominal súbita (Hochberg & Hamer, 2010). O diagnóstico definitivo só é possível quando endoscopicamente se remove e identifica a larva, sendo que nas formas intestinais e ectópicas esta prática é quase impossível (Shrestha *et al.*, 2014). Por isso, nestas situações o diagnóstico deve ser alcançado através de avaliações serológicas, como por exemplo ELISA (Hochberg & Hamer, 2010) ou pelo teste radio-alergo-absorvente (RAST) (EFSA, 2010), complementadas por exames imagiológicos (Shrestha *et al.*, 2014). Como o

diagnóstico definitivo é muitas vezes difícil de obter, a anisakiase é frequentemente confundida com outras entidades mórbidas (Shrestha *et al.*, 2014) como gastrite, apendicite, peritonite, gastroenterite eosinofílica, colecistite, neoplasia, IBD (Hochberg & Hamer, 2010) ou mesmo doença de Crohn (EFSA, 2010).

O tratamento de eleição consiste na remoção endoscópica ou cirúrgica da larva e do granuloma, dependendo da localização (Hochberg & Hamer, 2010). Alternativamente, as abordagens médicas não invasivas com o antiparasitário albendazole têm dado resultados animadores tanto *in vitro* (Ariaz-Diaz, Zuloaga, Vara, Balibrea & Balibrea, 2006) como *in vivo*, esta última numa posologia de 400 mg BID, PO, durante 5 dias (Pacios *et al.*, 2005) ou 6-21 dias (Hochberg & Hamer, 2010). Os corticosteróides são utilizados na resolução da inflamação decorrente da invasão parasitária, mas a prevenção continua a ser a melhor estratégia (EFSA, 2010). Frequentemente, após a remoção do parasita, parte da sintomatologia pode subsistir durante semanas a meses (Hochberg & Hamer, 2010; Baird *et al.*, 2014).

Por outro lado, *A. simplex* é também responsável por alergia, sendo o único parasita dos produtos da pesca com essa capacidade (EFSA, 2010). A sintomatologia inclui geralmente urticária, angioedema, rinite, broncoconstrição, sinais gastrointestinais (Baird *et al.*, 2014) ou ainda gengivoestomatite, que ocorrem geralmente menos de 5 horas depois do consumo do peixe ou cefalópodes infetados (Hochberg & Hamer, 2010). A conjugação rápida de todos estes sinais – anafilaxia ou choque anafilático – é igualmente possível e é potencialmente letal visto que há o risco de edema da glote (Audicana *et al.*, 2002). Foi recentemente descrito *A. simplex* como novo agente etiológico do síndrome de Kounis, cujos sinais cardiovasculares estão associados à alergia a este agente (Barbarroja-Escudero, Rodriguez-Rodriguez, Sanchez-Gonzalez, Antolin-Amerigo & Alvarez-Mon, 2013). Ainda existe controvérsia sobre a necessidade ou não de contacto prévio com o parasita vivo para desencadear uma resposta alérgica (Audicana *et al.*, 2002; Nieuwenhuizen *et al.*, 2006). Contudo, acredita-se que, mesmo morto, *A. simplex* poderá igualmente ser prejudicial ao desencadear uma resposta alérgica, até mesmo quando o próprio nemátode já não está fisicamente presente no alimento (Audicana & Kennedy, 2008; EFSA, 2010). Aliás, sabe-se hoje que o contacto com os alérgenos do *Anisakis* nem necessita ocorrer por via digestiva, tendo já ocorrido situações cutâneas, oculares e respiratórias (Audicana & Kennedy, 2008), respetivamente na forma de dermatite (Nieuwenhuizen *et al.*, 2006), conjuntivite (Añibarro & Seoane, 1998) e asma (Armentia *et al.*, 1998) alérgicas ocupacionais. Foi ainda publicado por Armentia *et al.* (2006) um estudo que demonstra a ocorrência de alergia a *A. simplex* em indivíduos que consumiram carne de frangos previamente alimentados com farinha proveniente de peixe contaminado com aquele nemátode. Por estas razões, admite-se que este parasita seja responsável por reações de hipersensibilidade do tipo I e do tipo IV, ou

seja, respostas imunológicas imediatas mobilizando IgE e respostas mediadas envolvendo linfócitos T (EFSA, 2010).

Até à data foram já identificadas 13 moléculas proteicas que são responsáveis por desencadear respostas alérgicas no Homem, todas elas provenientes de *Anisakis simplex* (s.l.) (Baird *et al.*, 2014) (Tabela 4). Estas podem ter 3 origens distintas no parasita: produtos de excreção/secreção (E/S); cuticulares; e somáticas (Audicana & Kennedy, 2008). Os alergénios principais (“*major allergens*”) são aqueles que são reconhecidos pelas IgE de mais de 50% dos pacientes e considera-se globalmente que o Ani s 1 e o Ani s 7 correspondam a esse estatuto (Moneo *et al.*, 2005; Klimpel & Palm, 2011; Baird *et al.*, 2014). Nos seus estudos, Quiazon *et al.* (2013) referem igualmente como “*major allergens*” o Ani s 2 e o Ani s 12. No entanto, Moneo *et al.* (2005) alertam que a frequência de reconhecimento não é sinónimo de relevância clínica, no ponto em que, como é exemplo o Ani s 4, um alergénio pode estar associado a sintomatologia mais severa apesar de ser mais raramente reconhecido pelas IgE (Tabela 4).

A alergia a *Anisakis* é frequentemente confundida com outras situações clínicas como a urticária aguda ou a alergia a peixe e, muitas vezes, a falta de correlação temporal faz subestimar a verdadeira responsabilidade de *A. simplex* nas situações alérgicas (Nieuwenhuizen *et al.*, 2006). Outra entidade patológica que poderá facilmente ser confundida com as manifestações alérgicas por sensibilização a alergénios de *Anisakis* é a intoxicação por histamina como resultado da ingestão de certas espécies de peixe não frescas (Kuehn, Swoboda, Arumugam, Hilger & Hentges, 2014). Como tal, o seu diagnóstico deve ser proposto quando, além de uma história pregressa compatível, o paciente apresenta resultado positivo ao teste cutâneo por picada (ou “*skin-prick test*”) para *Anisakis* e negativo para proteína de peixe, associados a níveis elevados de IgE específicas (EFSA, 2010; Hochberg & Hamer, 2010). Estas são medidas por radioimunoensaio (RIA) (Audicana *et al.*, 2002), *immunoCAP* ou *Immunoblotting* (Nunes, Ladeira & Mergulhão, 2003). Além destes, pode ser feita a confirmação da libertação de histamina e efetuado o teste de ativação de basófilos (BAT) (Audicana & Kennedy, 2008). O tratamento das formas clínicas alérgicas é sintomático, através de anti-histamínicos e corticosteróides ou, por vezes, epinefrina (EFSA, 2010). A Direção-Geral da Saúde (2012) aconselha a administração precoce desta última como a primeira linha de tratamento em caso de anafilaxia, na dose de 0,01 mg/kg (solução a 1:1000) por via intramuscular.

Tabela 4. Alergénios de *Anisakis simplex*.

Alergénio	Localização	Características	Reatividade *
Ani s 1	Produto de excreção /secreção (E/S)	Termoestável ¹	85%
Ani s 2	Somático (músculo)	?	88%
Ani s 3	Somático (músculo)	Termoestável ¹	?
Ani s 4	E/S e (sub)cuticular	Termoestável ¹ e resistente à pepsina	27%
Ani s 5	E/S	Termoestável ¹	49%
Ani s 6	E/S	?	18%
Ani s 7	E/S	?	100%
Ani s 8	E/S	Termoestável ¹	25%
Ani s 9	E/S	Termoestável ¹	13%
Ani s 10	Somático ou cuticular	Termoestável ¹	39%
Ani s 11	?	?	47%
Ani s 11-li	?	?	?
Ani s 12	?	?	57%

Legenda: *em pacientes sensibilizados; ¹30 minutos à temperatura da ebulição da água.

Adaptado de Rodriguez-Mahillo *et al.* (2007), Audicana e Kennedy (2008), Caballero *et al.* (2008), Rodriguez-Perez, Moneo, Rodriguez-Mahillo e Caballero (2008), Vidaček *et al.* (2009), Caballero, Umpierrez, Moneo e Rodriguez-Perez (2011), Quiazon, Zenke e Yoshinaga (2013) e Baird *et al.* (2014).

1.2. Epidemiologia da anisaquidose

A primeira vez que um ascarídeo marinho foi observado no trato gastrointestinal de um ser humano foi em 1876, quando Leuckart relatou uma criança na Gronelândia que vomitou um parasita (Nunes *et al.*, 2003; Hochberg & Hamer, 2010). Porém, apenas em 1960 Van Thiel descreveu o envolvimento de uma larva de *Anisakis* como causa de doença gastrointestinal humana (Audicana & Kennedy, 2008; Mattiucci & Nascetti, 2008; Baird *et al.*, 2014) depois de um paciente seu, nos Países Baixos, ter consumido arenque marinado – o tradicional “*nieuwe*” – contaminado (Hochberg & Hamer, 2010). Desde aquela altura, o número de notificações da doença tem vindo a aumentar substancialmente em todo o globo (Hochberg & Hamer, 2010; Herrero *et al.*, 2011; Shrestha *et al.*, 2014). Isto poderá dever-se a vários fatores: o incremento da prevalência do parasita nos produtos da pesca e sua vasta distribuição (Herrero *et al.*, 2011); a proliferação dos hospedeiros definitivos devido a programas de conservação (Kuhn *et al.*, 2011); o crescimento da popularidade de tendências gastronómicas exóticas utilizando peixe tendencialmente cru (Kuhn *et al.*, 2013); o recurso crescente a técnicas de confeção mais práticas e rápidas sem cozinhar demasiado os alimentos; o reconhecimento dos benefícios do peixe para a saúde e a sua fama na dieta mediterrânea (Audicana & Kennedy, 2008); ou ainda melhores técnicas de diagnóstico (EFSA, 2010; Hochberg & Hamer, 2010). Ora, dos cerca de 20 000 casos de

anisaquidose reportados em todo o mundo, mais de 90% ocorreram no Japão (EFSA, 2010), tendencialmente nas zonas costeiras (Hochberg & Hamer, 2010) em homens entre os 20 e os 50 anos (Audicana *et al.*, 2002; Audicana & Kennedy, 2008). Apenas neste país insular são identificados entre 2 000 e 3 000 casos de anisaquiose todos os anos (Audicana *et al.*, 2002; Baird *et al.*, 2014; Shrestha *et al.*, 2014). Na Europa, dos cerca de 500 casos anuais (Klimpel & Palm, 2011), mais de 95% são provenientes apenas de 4 estados: Países Baixos, Alemanha, França e Espanha (Audicana *et al.*, 2002; Hochberg & Hamer, 2010). Contrariamente, e ainda que subdiagnosticado, nos EUA são apenas comunicados cerca de 50 a 60 situações de anisaquidose por ano, das quais, curiosamente, a maioria diz respeito a pseudoterranovose (Hochberg & Hamer, 2010). Foram igualmente descritas ocorrências no Egito, Coreia do Sul, Nova Zelândia e vários países da América latina nos últimos anos (Audicana & Kennedy, 2008). Paradoxalmente, na China, e apesar do consumo de peixe cru ser usual, tal como no vizinho Japão, apenas em 2013 foi publicado o primeiro caso humano de anisaquiose (Baird *et al.*, 2014). Em estudos referenciados por Audicana e Kennedy (2008) é sugerido que esta situação poder-se-á dever ao facto de os chineses, ao contrário dos japoneses, consumirem o peixe no final das refeições quando o estômago já está repleto, condimentando-o mais frequentemente com folhas de perila roxa (*Perilla frutescens*) e gengibre (*Zingiber officinale*), que possuem compostos que são letais para as L3. Outros autores como Hochenberg e Hamer (2010) destacam que, no Japão, devido à exímia deteção de larvas e maior sensibilização dos preparadores de “sushi”, o risco de contração de anisaquiose é maior nas refeições caseiras do que nos estabelecimentos da especialidade. De facto, os países com tradição gastronómica de ingestão de produtos da pesca insuficientemente confeccionados apresentam maior probabilidade de infeção, tendência que se difundiu com a globalização (Kuhn *et al.*, 2011). A título de exemplo destacam-se alguns pratos típicos em que o risco é considerado elevado: o “sushi” e o “sashimi” do Japão; o “nieuwe” dos Países Baixos; o “gravlax” escandinavo; o “lomi-lomi” e o “palu” do Havai (Audicana & Kennedy, 2008); o “ceviche” sul-americano; os “boquerones en vinagre” de Espanha (Audicana *et al.*, 2002; Hochberg & Hamer, 2010; Baird *et al.*, 2014); o “kilawin” (Quiazon *et al.*, 2013) e o “bagoong” filipinos (Audicana & Kennedy, 2008); o “carpaccio” veneziano (Brutti *et al.*, 2010); o “alici marinate” napolitano (EFSA, 2010); e os “rollmöpse” da Alemanha (Klimpel & Palm, 2011). A confeção destas iguarias envolve, em alguns casos, processos como a salga, a cura, a fumagem a frio ou a adição de especiarias e substâncias ácidas (marinada), os quais, nestes métodos tradicionais, não asseguram a morte das larvas de *Anisakis* no peixe (Audicana & Kennedy, 2008). De forma similar, e dado que já foram detetadas larvas de *Anisakis* no estômago de gatos destinados ao consumo humano num mercado em Seul (Huh *et al.*, 1993), é igualmente importante referir o risco teórico de determinadas especialidades chinesas e coreanas confeccionadas a partir deste felino na transmissão do parasita ao Homem.

Os produtos da pesca mais frequentemente associadas à transmissão humana no Japão são a cavala (*Scomber japonicus*) e a lula-voadora-japonesa (*Todarodes pacificus*) enquanto na Europa o arenque (*Clupea harengus*), o biqueirão (*Engraulis encrasicolus*) e a sardinha (*Sardina pilchardus*) são as espécies de peixe que mais vezes foram incriminadas em casos de anisaquiose (Audicana *et al.*, 2002; Audicana & Kennedy, 2008; Klimpel & Palm, 2011). Já nos EUA, a maioria dos casos de anisaquidose têm sido devido ao consumo de salmão (*Oncorhynchus* spp.) (Audicana & Kennedy, 2008). Quanto às situações de alergia, a pescada-do-Atlântico (*Merluccius merluccius*) foi apontada em Espanha como a principal fonte dos anisaquídeos zoonóticos (Audicana *et al.*, 2002; Audicana & Kennedy, 2008). Do mesmo modo, importa salientar que os grupos de risco da alergia ocupacional a *Anisakis* são conhecidos e incluem os vendedores de peixe (Audicana *et al.*, 2002), os operários de fábricas de produtos da pesca (Nieuwenhuizen *et al.*, 2006), os pescadores (Audicana & Kennedy, 2008), os cozinheiros e todos os trabalhadores que estejam expostos, com frequência, a estes produtos (EFSA, 2010). Enquanto em Itália, *A. pegreffii* tem sido apontada como a principal espécie na origem dos casos de anisaquiose, no Japão a análise genética dos anisaquídeos removidos de humanos tem revelado uma grande prevalência de *A. simplex* (s.s.) (Quiazon *et al.*, 2011b; Baird *et al.*, 2014). Igualmente, nas situações alérgicas, *A. simplex* (s.l.) é apontado como o principal responsável (Audicana *et al.*, 2002). Audicana e Kennedy (2008) sugerem que poderá existir uma predisposição genética no Homem visto que existem povos, como o japonês e o basco, que parecem ser mais sensíveis à alergia a *Anisakis*. Em Portugal não existem casos documentados de anisaquidose, mas um estudo epidemiológico conduzido por Nunes *et al.* (2003) no Barlavento algarvio, verificou que uma percentagem significativa da população apresenta anticorpos anti-*Anisakis* e aconselham uma investigação mais aprofundada no nosso país. Uns anos mais tarde, Falcão, Lunet, Neves, Iglésias e Barros (2008) dirigiram outro ensaio, desta vez na área metropolitana do Porto, onde constataram que o risco de urticária aguda recidivante é 3 vezes superior nos pacientes portugueses sensibilizados por *Anisakis*. Foram já assinaladas várias espécies infetadas por anisaquídeos na costa portuguesa, nomeadamente o carapau (*Trachurus trachurus*), a sardinha (*Sardina pilchardus*) e a pescada-do-Atlântico (*Merluccius merluccius*) (Borges, 2008). Desempenham, por isso, um papel relevante como via de sensibilização para o parasita e representam possíveis fatores de risco na população portuguesa.

1.3. Aspetos sanitários

Na opinião dos peritos da EFSA (2010), devem ser ressaltados três pontos para uma maior eficácia na prevenção da exposição dos consumidores aos parasitas dos produtos da pesca. São eles: a salubridade da matéria-prima, pela captura e criação de *stocks* livres de parasitas; a aplicação de tratamentos físico-químicos para assegurar a inativação de

qualquer forma parasitária eventualmente presente no peixe e cefalópodes; e a separação física dos produtos da pesca parasitados durante o seu processamento.

Relativamente ao primeiro ponto pode-se afirmar que, devido a fatores como a distribuição global do parasita e ao seu grande número de hospedeiros, os anisaquídeos podem estar virtualmente presentes em qualquer peça de peixe ou cefalópodes selvagens com interesse económico. Além disso, a informação epidemiológica relevante é ainda escassa. No que respeita a aquicultura, apenas no caso do salmão-do-Atlântico (*Salmo salar*) em certos regimes altamente controlados (alimento, medicamento e água/ambiente), se pode afirmar que o risco de infeção parasitária é negligenciável (EFSA, 2010).

No âmbito do segundo ponto, refere-se que os processos que asseguram a inviabilização do parasita são diversificados e podem dividir-se em químicos e físicos (Tabela 5). Ora, sanitariamente falando, uma larva de parasita viável é aquela que se apresenta fisicamente intacta e dotada de mobilidade, demonstrável através de movimentos espontâneos estimulados pelo contacto com uma pinça e/ou agulha (EFSA, 2010). Começemos pelos métodos químicos. Segundo o organismo francês para a segurança alimentar (AFSSA, 2007) a salga poderá ser uma opção para a inativação larvar pois os anisaquídeos são sensíveis a diversas conjugações de condições ecológicas, como por exemplo: 21 dias em contacto com sal seco ou salmoura saturada; ou 21 dias em salmoura contados a partir do momento em que o nível de sal na fase aquosa do tecido do peixe atinge 20%; ou 28 dias em salmoura se o nível alcançado de sal for de 15%. A marinada, por outro lado, consiste na adição de substâncias geralmente ácidas (por exemplo vinagre, vinho ou limão) e sal ao produto para lhe alterar as características químicas e físicas, com ou sem tratamento térmico posterior (EFSA, 2010). Na realidade, os anisaquídeos são resistentes aos processos tradicionais de marinada, pois as janelas temporais adotadas por motivos económicos e organoléticos são insuficientes (AFSSA, 2007). Depois de diversos estudos em várias espécies de pescado e múltiplas substâncias, foram propostos 2 métodos principais de marinada que eliminam as formas larvares de *Anisakis*: o método alemão, que corresponde a uma mistura de 14% de sal, 7% de ácido acético e peróxido de hidrogénio durante 5 semanas a 3 °C; e o método dinamarquês, no qual a uma fase inicial com 10% de sal durante 17 horas a 12 °C se segue outra etapa, fazendo uso de 10% de sal e 5% de ácido acético, que se prolonga por 6 semanas a 3 °C (AFSSA, 2007; EFSA, 2010). O uso alimentar de peróxido de hidrogénio está atualmente proibido em vários países do espaço europeu (EFSA, 2010), incluindo Portugal (ASAE, 2014). Outros procedimentos, com tempos de aplicação mais curtos e práticos, são citados pela EFSA (2010) e pela AFSSA (2007). Destaca-se a mistura de 10% de ácido acético com 12% de sal durante 5 dias, que é satisfatório até do ponto de vista organolético. Nos seus trabalhos, Giarratana, Muscolino, Beninati, Giuffrida e Panebianco (2014) referem ainda o poder larvívica do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris*) e da camomila (*Matricaria chamomilla*) como cientificamente

interessantes. E, para completar a lista de processos químicos, referem-se os extratos de gengibre (*Zingiber officinale*) e perila roxa (*Perilla frutescens*) já anteriormente expostos (Audicana & Kennedy, 2008; EFSA, 2010). O principal processo físico de referência na inativação larval é a temperatura (EFSA, 2010), cuja associação com o tempo – binómio tempo/temperatura – é o único tratamento aprovado oficialmente (abordado no ponto seguinte). Na sequência de inúmeros estudos, é hoje globalmente aceite que, quer a congelação a -35 °C por 15 horas ou a -15 °C por 96 horas, quer a cozedura a temperaturas no centro do produto superiores a 60 °C por, pelo menos, 1 minuto, são os procedimentos que garantem a destruição larvar (EFSA, 2010). É, no entanto, de suma importância referir que, de acordo com Vidaček *et al.* (2009), a ingestão de peixe parasitado por *Anisakis* poderá causar alergia a pacientes sensibilizados até mesmo depois de o produto ter sido congelado e cozinhado a temperaturas que garantem a inativação larvar. Por conseguinte, estes tratamentos térmicos não protegem o consumidor contra os riscos de reação alérgica (EFSA, 2010). Não obstante, é reconhecido pela Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA, 2010) que o consumo de produtos da pesca contendo larvas viáveis de *A. simplex* representa maior risco de potenciar reações alérgicas do que quando estas estão inativadas e, consequentemente, a prevenção da sensibilização deve começar na prevenção da infeção. Dos processos físicos constam ainda a fumagem, que apenas é eficaz quando realizada a quente, ou seja, quando se atingem 70-80 °C durante 3-8 horas (AFSSA, 2007; EFSA, 2010). As altas pressões hidrostáticas têm igualmente algum sucesso. Brutti *et al.* (2010) chegaram à conclusão que com 300 MPa de pressão, durante 5 minutos, todas as larvas de anisquídeos são inativadas, porém o produto da pesca perde algumas das suas características organoléticas. Isto limita a sua aplicação na indústria e, segundo a AFSSA (2007), a relativa falta de conhecimento inviabiliza, de todo, a sua utilização em processos de descontaminação. Também não são recomendadas a irradiação (ou ionização) e a corrente de baixa voltagem. Tanto a EFSA (2010) como a AFSSA (2007) concordam no ponto em que estes processos, para além de ainda pouco estudados, provocam alterações de consistência no produto consideradas inaceitáveis.

Tabela 5. Exemplos de processos que asseguram a inviabilização das larvas de anisquídeos.

Métodos químicos	Salga	Sal seco ou salmoura – 21 dias*
	Marinada	10% ácido acético e 12% sal – 5 dias*
	Outras substâncias	Tomilho, camomila, gengibre e perila roxa
Métodos físicos	Temperatura	-20°C – 24 horas ou 60°C – 1 minuto*
	Fumagem	70-80°C – 3-8 horas*
	Pressão hidrostática	300 MPa – 5 minutos*

*valores mínimos. Adaptado de AFSSA (2007); Brutti *et al.* (2010), EFSA (2010) e Giarratana *et al.* (2014).

O último dos pontos é a excisão dos parasitas durante o processamento. Para isso é necessário primeiro assinalar as larvas para então as remover. As técnicas utilizadas na detecção física e química de anisacídeos no pescado são variadas (Tabela 6). Os métodos não destrutivos incluem: o controlo visual simples (Llarena-Reino, González, Vello, Outeiriño & Pascual, 2012); a transiluminação com luz branca, fazendo uso de uma fonte luminosa forte contraposta a um filete ou peixe chato que poderá sugerir silhuetas parasitárias (Berland, 2006; Herrero *et al.*, 2011); e a prensagem com irradiação UV (Petrie *et al.*, 2007), que revela a fluorescência difundida pelas formas larvares mortas ou em *stress* (Vidaček *et al.*, 2009). As técnicas destrutivas englobam a digestão enzimática do peixe, através de pepsina e HCl (Berland, 2006) e a eluição que evidencia os parasitas sedimentados (Herrero *et al.*, 2011) assim como a disseção. As primeiras, nomeadamente a inspeção visual e a transiluminação, são usadas na indústria, mas, apesar de práticas e económicas, são pouco eficientes (Berland, 2006) e todas têm a desvantagem de apenas detetarem fisicamente o parasita inteiro ou secções macroscópicas do seu corpo, não sendo pois úteis quando aplicadas em produtos que sofreram alterações substanciais da sua estrutura como é o caso do *surimi* (Herrero *et al.*, 2011). Por outro lado, existem ainda as técnicas imunológicas e moleculares que podem ser executadas tanto em produtos da pesca frescos como processados (Herrero *et al.*, 2011). Destas, destacam-se o *Immunoblotting* por intermédio de IgG e a ELISA e ainda as técnicas derivadas da PCR (Baird *et al.*, 2014), como a PCR em tempo real, o RFLP e a SSCP (Herrero *et al.*, 2011). Apesar de claramente mais dispendiosas e demoradas, e por isso impraticáveis à escala industrial, são bastante mais sensíveis e permitem igualmente a detecção química de proteínas parasitárias isoladas (Herrero *et al.*, 2011).

Tabela 6. Técnicas usadas na detecção de anisacídeos em produtos da pesca.

Detecção física (direta)	Métodos não-destrutivos	Controlo visual simples*
		Transiluminação*
		Prensagem e UV
	Métodos destrutivos	Digestão enzimática e eluição
Detecção química (indireta)	Métodos imunológicos	Disseção
		<i>Immunoblotting</i>
		ELISA
	Métodos moleculares	<i>Real-time</i> PCR
		PCR-RFLP
		PCR-SSCP

*Usadas na indústria. Adaptado de Berland (2006), Vidaček *et al.* (2009), Herrero *et al.* (2011), Llarena-Reino *et al.* (2012) e Baird *et al.* (2014).

1.4. Enquadramento legal

Uma das primeiras nações na Europa a legislar a congelação do peixe como tratamento preventivo da anisakiase foram os Países Baixos, quando em 1968 decretaram que o arenque fresco deveria ser sujeito a temperaturas de, pelo menos, -20°C por 12 horas e armazenado por um período de 24 horas antes de ser colocado no mercado. Como consequência da adoção desta medida resultou um decréscimo em cerca de 80% no número de casos por ano. Posteriormente, em 1987, a então Comunidade Económica Europeia (CEE) seguiu essa linha preventiva e decidiu implementar igualmente procedimentos de gestão de risco baseados em medidas semelhantes (EFSA, 2010). No que diz respeito aos produtos da pesca e os seus parasitas, atualmente vigora na União Europeia (UE) o Regulamento 853/2004. No ponto D, do capítulo III, da sua secção VIII, pode ler-se que cabe aos operadores das empresas do sector alimentar garantir que os produtos da pesca destinados a ser consumidos crus ou marinados, salgados e quaisquer outros cujo tratamento não elimine o parasita viável, sejam sujeitos a congelação. Todas as partes do produto devem, consequentemente, atingir, no mínimo: -20°C durante pelo menos 24 horas; ou -35°C durante pelo menos 15 horas. Importa salvaguardar o facto de estarem isentos desta obrigação todos os produtos da pesca que: tiverem sido ou se destinem a ser submetidos a um tratamento térmico antes de consumidos que, no caso dos anisakiídeos, deve atingir pelo menos 60°C , durante, no mínimo, 1 minuto; foram submetidos a uma congelação suficientemente longa para eliminar os parasitas; provenham de pescueiros, cuja comprovação epidemiológica indique que não representam risco sanitário e sobre os quais a autoridade competente emite uma permissão especial; derivem de produção aquícola da qual não haja dúvida quanto à ausência do risco sanitário, por a criação ser realizada num ambiente indemne de parasitas ou por verificações efetuadas pelo operador mas aprovadas pela autoridade competente, que garantam a segurança dos referidos produtos no que concerne a ausência dos parasitas. O mesmo ponto refere ainda que o operador deve fornecer documentos nos quais conste a situação sanitária dos produtos da pesca, aquando da sua colocação no mercado, juntamente com os mesmos, exceto se fornecidos ao consumidor final. Ainda que não totalmente averiguado o mecanismo de migração larvar (EFSA, 2010) o ponto A do mesmo capítulo e secção do supracitado Regulamento Europeu, recomenda a evisceração rápida e higiénica dos produtos da pesca sempre que esta seja possível, quer do ponto de vista técnico quer comercial, como medida preventiva da migração muscular (Ventura, Tummo, Di Leo, D'Ersasmo & Arsieni, 2008). No ponto D do capítulo V da mesma secção consta ainda a referência à obrigatoriedade de submissão dos produtos da pesca a eles afetos a um exame visual para deteção de parasitas visíveis por parte dos operadores das empresas do sector alimentar. É clarificado pelo mesmo ponto que não poderão ser colocados no mercado, para consumo humano, produtos obviamente parasitados.

A secção I, do anexo II do Regulamento 2074/2005 estabelece as obrigações dos operadores das empresas do sector alimentar no que concerne os produtos da pesca, definindo as regras pormenorizadas relacionadas com as inspeções visuais para detetar parasitas nesses mesmos produtos. O capítulo I elucida o leitor que um parasita visível é aquele que possui uma dimensão, cor ou textura que o distingue claramente dos tecidos do peixe. No capítulo II, ponto 1, pode ler-se que a inspeção visual deve ser feita num número representativo de amostras e que, durante a produção, essa inspeção aos peixes eviscerados deve ser realizada por pessoas qualificadas, na cavidade abdominal, nos fígados e nas ovas destinadas a consumo humano. Na evisceração manual, a inspeção deve ser contínua por parte do manipulador, no momento da evisceração e lavagem. No caso de a evisceração ser mecânica, a inspeção deve ser por amostragem num número representativo de amostras não inferior a 10 peixes por lote. O ponto 2 do mesmo capítulo esclarece que a inspeção visual dos filetes e postas de peixe deve ser realizada no momento em que os peixes são aparados e depois da filetagem ou do corte das postas, referindo ainda que, caso não seja possível efetuar o exame visual individual, deve ser elaborado um plano de amostragem no qual esteja incluída, sempre que tecnicamente necessária, a transiluminação.

Todos os produtos da pesca que não cumpram a legislação comunitária supracitada devem ser declarados impróprios para consumo (DGAV, 2014).

Nos Estados Unidos da América (EUA), a autoridade para a segurança alimentar (Food and Drug Administration, FDA) estabelece parâmetros semelhantes para os produtos da pesca destinados a ser consumidos crus ou insuficientemente confeccionados (marinados ou parcialmente cozinhados): pelo menos -4°F (-20°C) durante 7 dias; ou no mínimo -31 °F (-35 °C) durante 15 horas; ou ainda o arrefecimento a, pelo menos, -31 °F (-35 °C) até atingir o estado sólido e o armazenamento posterior a um mínimo de -4 °F (-20 °C) durante 24 horas (FDA, 2011). A diferença entre os binómios tempo/temperatura dos regulamentos da UE e os dos EUA explica-se, parcialmente, por a FDA considerar o tempo total de armazenamento enquanto a UE tem em conta o tempo durante o qual o produto deve ser submetido assim que a temperatura desejada é alcançada no seu centro (AFSSA, 2007).

No Japão, a legislação não é muito específica no que diz respeito aos parasitas do pescado, na medida em que não prevê qualquer tratamento físico ou químico preventivo obrigatório (Fisheries Agency, 2012). Cabe, por isso, a cada operador decidir se submete o pescado a algum processo que elimine as formas larvares, contando com o bom senso e experiência dos preparadores para garantir um nível aceitável de risco parasitário.

II. Detecção, quantificação e identidade dos anisquídeos encontrados em carapau (*Tachurus trachurus*) em Portugal (estudo de caso)

2. Introdução e objetivos

O género *Anisakis* representa, portanto, um problema de segurança sanitária incontornável, particularmente nas sociedades que têm captações de consumo de produtos da pesca muito elevados, como é o caso da portuguesa. Importa, assim, desenvolver estudos com o objetivo de elucidar o modo como essas sociedades se expõem ao parasita. Das múltiplas espécies íctias e moluscos que podem ser parasitados por *Anisakis* foi escolhido o carapau (*Tachurus trachurus*), uma espécie de consumo muito popularizado em Portugal, para se proceder a um rastreio preliminar da ocorrência do parasita em produtos da pesca que são colocados no mercado nacional.

Nesta etapa do trabalho procurou-se investigar alguns aspetos da questão que impactam com a saúde pública veterinária, nomeadamente:

- i. Determinar a frequência deste parasita em exemplares de carapau da costa portuguesa descarregados na lota de Peniche assim como a intensidade e abundância parasitárias;
- ii. Relacionar fatores como o comprimento, o peso e o sexo dos hospedeiros com a abundância parasitária e, dentro desta, relacionar a frequência do parasitismo nas vísceras e na musculatura hipaxial abdominal;
- iii. Caracterizar morfológicamente as larvas de *Anisakis* encontradas e determinar o seu tipo (*sensu* Berland, 1961);
- iv. Comparar os resultados com outros estudos e inferir quanto ao risco sanitário dos espécimes detetados.

O estudo de *Anisakis* em carapaus capturados pela frota piscatória nacional na zona costeira do continente português tem também por objetivo fornecer elementos de carácter metodológico e epidemiológico capazes de permitir às autoridades competentes portuguesas perspectivar a relevância destes parasitas nos produtos da pesca nacionais. Este objetivo de cariz mais institucional corresponde a uma preocupação geral decorrente da relativa escassez de informação sobre assunto em Portugal.

2.1. O Hospedeiro – carapau (*Trachurus trachurus*)

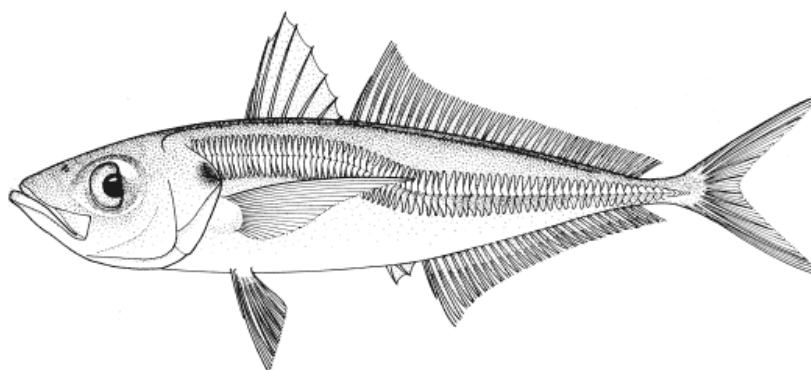
O carapau (*Trachurus trachurus*), também conhecido por carapau-branco, chicharro, chicharro-branco, “jaquinzinho” ou “pelim” (Sanches, 1989), foi descrito cientificamente pela primeira vez em 1758 pelo naturalista sueco Carolus Linnaeus, aquando da publicação da décima edição do seu livro “*Systema Naturae*”. Pertence ao reino *Animalia*, filo *Chordata*, classe *Actinopterygii*, ordem Perciformes, família *Carangidae* e ao género *Trachurus* (Integrated Taxonomic Information System, 2014). Pode ainda ser integrado no grupo dos peixes teleósteos torácicos, pois tem o esqueleto completamente ossificado e as barbatanas ventrais estão situadas no plano transversal que passa pela base das peitorais (Bernardo, 2013). A etimologia do nome do género faz referência a um atributo anatómico distintivo e remonta ao grego clássico, onde “*trachys*” significa áspero e “*oura*” é sinónimo de cauda. É muito abundante na costa ibérica e atribui-se a este peixe um enorme significado alimentar e económico na História de Portugal (Bernardo, 2014).

2.1.1. Morfologia e ecologia

De acordo com a Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (FAO, 2014c) esta espécie caracteriza-se por ter um corpo alongado, razoavelmente comprimido (Figura 4). A cabeça robusta exhibe um maxilar inferior projetado e o bordo posterior do maxilar superior atinge geralmente a margem anterior do olho. A maxila é grande, larga e não está coberta pelo osso lacrimal. O olho está munido de uma pálpebra adiposa bem desenvolvida e as narinas, de pequena dimensão, encontram-se relativamente próximas, sendo a anterior oval e a posterior em forma crescente. Apresenta ainda um entalhe distinto na margem posterior do opérculo. A região interorbital é ligeiramente arqueada, sendo a sua largura geralmente superior ao diâmetro do olho. A cintura escapular (ou “*cleithrum*”) tem margem lisa e não possui papilas. Possui 2 barbatanas dorsais. A primeira é mais alta e apresenta 2 espinhos ligados por uma membrana (Bernardo, 2013), enquanto a segunda possui 29-33 raios moles. A barbatana anal, oposta à segunda dorsal, tem 24-29 raios moles, precedidos por 2 espinhos fortes, com um pequeno espaçamento. A barbatana ventral, que possui 5 raios moles, é de tamanho moderado e tem a sua origem ao nível da inserção da barbatana peitoral. Possui duas linhas laterais, uma principal e uma acessória. A acessória percorre o bordo dorsal do corpo e termina ventralmente aos raios 23-31 da segunda barbatana dorsal. A linha lateral principal é revestida por fortes e grandes escamas, designadas de escudetes, devido ao seu formato em escudo. A sua porção curva, mais anterior, possui 33-40 escudetes expandidos dorsolateralmente, já a sua secção reta, posterior, apresenta-os em número 31-36. No total existem 66-75 deste tipo de escamas diferenciadas ao longo de toda a linha lateral principal (FAO, 2014c). Segundo Bernardo (2013) este número distingue-o do carapau-negrão (*T. picturatus*), que está munido de cerca de 90 destas estruturas. A cor não tem marcas distintivas com exceção da mancha

opercular negra no bordo superior. A parte superior do corpo e da cabeça variam em tons escuros que podem ir do cinzento até ao verde azulado ou mesmo quase ao negro. Os dois terços inferiores são geralmente mais pálidos, alternando entre o prateado e o esbranquiçado. O seu comprimento até à bifurcação da barbatana caudal pode atingir 60 cm mas geralmente tem entre 15 e 30 cm (FAO, 2014c). Importa salientar que quando tem menos de 11 cm, *T. trachurus* recebe a denominação vernacular de “jaquinzinho” ou “pelim” e muitas vezes quando maior que 20 cm é conhecido por chicharro (Bernardo, 2013).

Figura 4. Anatomia externa do carapau (*T. trachurus*) (FAO, 2014c).



O carapau é uma espécie marinha considerada bento-pelágica, ou seja, desenvolve a sua atividade biológica ao nível da coluna de água assim como nos fundos oceânicos, geralmente sobre superfícies arenosas entre os 100 e os 200 metros de profundidade. Apesar de já ter sido descrito a mais de 1000 metros de profundidade, pode ocasionalmente também ser observado perto da superfície (FAO, 2014c). Segundo Bernardo (2014) trata-se de um peixe característico da zona nerítica, ou seja, o meio hídrico geralmente bem iluminado que cobre a plataforma continental.

É uma espécie gregária e coexiste em grandes cardumes (Bernardo, 2013), muitas vezes juntamente com arenques juvenis (*Clupea harengus*) e outras espécies do género *Trachurus*, como o carapau-do-Mediterrâneo (*T. mediterraneus*) e o carapau-negrão (*T. picturatus*) (FAO, 2014c). Foi ainda observado em grupos compostos com sardas (*Scomber scombrus*) (Abaunza *et al.*, 2003). O seu habitat distribui-se pelas águas frias, temperadas e subtropicais do Atlântico nordeste, da Islândia ao Senegal, incluindo a Península Ibérica, as ilhas de Cabo Verde, o Mar Mediterrâneo e raramente o Mar Negro (Murta, Abaunza, Cardador & Sánchez, 2008; Vázquez-Rowe, Moreira & Feijoo, 2010; FAO, 2014c). Encontra igualmente refúgio na plataforma continental ao nível do Mar da Noruega e Mar do Norte (Abaunza *et al.*, 2003).

Parece certo que *T. trachurus* pode atingir uma longevidade de 40 anos e apresenta crescimento isométrico, ou seja, não há alteração das dimensões relativas das várias partes

do corpo do animal ao longo do crescimento. Até aos 3 anos de idade o crescimento é mais rápido. Como tal, é difícil estabelecer uma relação consistente entre o comprimento do animal e a sua idade e, por isso, o método mais usado para determinar esse parâmetro no carapau é a análise do otólito do ouvido interno e contagem dos respetivos anéis translúcidos (Abaunza *et al.*, 2003). Esta estrutura calcária tem como função a transmissão de informação mecânica por meio de vibração a pequeníssimos cílios acoplados a fibras nervosas (Evans, 1998). No carapau existem 3 destas peças anatómicas mas é a maior delas (designada “*sagitta*”) que é mais largamente utilizada para estimar a idade nos peixes. O otólito apresenta bandas opacas e translúcidas que correspondem a períodos de crescimento rápido e lento, respetivamente. Este processo é quase constante ao longo da vida do animal (Abaunza *et al.*, 2003).

A alimentação de *T. trachurus* está associada a zonas costeiras. De acordo com os trabalhos desenvolvidos por Cabral e Murta (2002) na costa portuguesa, o zooplâncton representa o principal elemento na dieta do carapau, principalmente numa idade mais jovem. Mais concretamente, crustáceos da sub-classe *Copepoda* e da ordem *Euphausiacea*, mais conhecidos pelo termo vernacular *Krill*, como *Meganyctiphanes norvegica* e *Nyctiphanes couchii*. Este último representa a maioria da biomassa de alimento ingerido pelo carapau. Além destes, fazem também parte da sua dieta larvas e ovos de peixe, assim como cefalópodes e mesmo pequenos peixes, tais como o biqueirão (*Engraulis* spp.), o caboz (*Gobius* spp.) e o peixe-lanternas (*Myctophidae* spp.) (Costa, 2001). Este facto torna-se especialmente evidente à medida que o indivíduo cresce e o instinto predatório se acentua, fator que poderá estar relacionado com a mudança de habitat para águas mais profundas. Apesar da sua diversidade de presas ser mais acentuada durante o outono, os eufasídeos representam o principal elemento da sua dieta em qualquer época do ano. Parecem, no entanto, haver dados que sugerem que existe alguma sazonalidade na alimentação do carapau no Mar da Cantábria, onde durante a primavera se alimenta principalmente de crustáceos, enquanto no outono a sua dieta é composta maioritariamente por peixes e anfípodes (Cabral & Murta, 2002). Durante o inverno, a percentagem de indivíduos com o estômago vazio é máxima, evidenciando a queda na taxa de ingestão nesta altura do ano (Cabral & Murta, 2002; Yankova, Rayov & Fratera, 2008). A digestão de *T. trachurus* é relativamente rápida quando comparada com a do bacalhau-do-Atlântico (*Gadus morhua*) e a do badejo (*Merlangius merlangus*). No entanto, este facto depende não apenas do tipo de presa e seu conteúdo energético mas também fortemente da temperatura. Sabe-se, por exemplo, que a 13 °C a quantidade de alimento ingerida é o dobro daquela verificada a 10,7 °C (Abaunza *et al.*, 2003).

O carapau é um bom nadador e está adaptado à natação lenta mas constante. Apresenta flutuabilidade neutra e pode permanecer imóvel apenas com suaves movimentos das barbatanas peitorais. Esta é uma espécie migratória que possui áreas distintas para

reprodução, alimentação e passar o inverno, sendo a sua deslocação desencadeada pela temperatura da água e disponibilidade de presas. Aparentemente, a temperatura de 8 °C é o limite mínimo para o carapau. Abaixo dos 9 °C pára de se alimentar e desloca-se para águas mais quentes. As temperaturas ótimas situam-se entre os 19 e os 23 °C, pelo que raramente habita águas com temperaturas superiores. Durante o outono os juvenis são mais abundantes na região noroeste da costa portuguesa, enquanto na primavera estes apresentam-se predominantemente no litoral algarvio. Os adultos distribuem-se geralmente por toda a costa continental mas ocorrem em maiores concentrações nas regiões sul durante o inverno e a primavera (Murta, Abaunza, Cardador & Sánchez, 2008).

Segundo Abaunza *et al.* (2003) o carapau atinge a maturidade sexual entre os 16 e os 25 cm, mais comumente aos 21 cm. Os machos tornam-se maduros geralmente com um comprimento menor do que as fêmeas, que adquirem esse estatuto entre os 2 e os 4 anos de idade, dependendo da localização. A época reprodutiva do carapau pode ser bastante longa, até 8 meses. Pensa-se que poderá haver uma relação entre a temperatura e o início da época reprodutiva, sendo que esta ocorre, geralmente, em alturas mais quentes. Em regra, pode-se considerar que, no Atlântico nordeste, quanto maior é a latitude mais tardio é o início da época reprodutiva, enquanto mais a sul este período se revela mais alargado. Quanto ao Mediterrâneo, parece começar em dezembro e é mais longa nas regiões mais a leste. A temperatura parece ser também decisiva no desenvolvimento dos ovos e larvas.

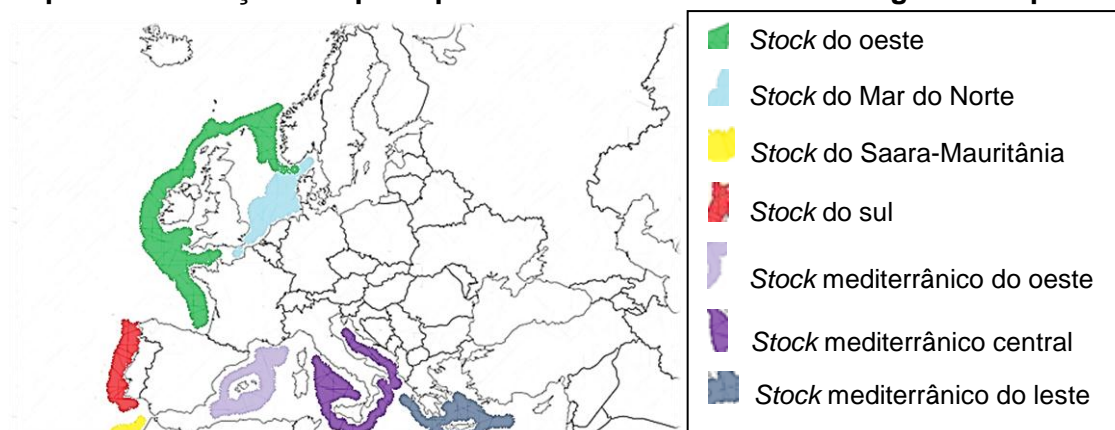
Na costa portuguesa a duração da época de reprodução de *T. trachurus* pode variar consoante a região. No norte e centro é de fevereiro a maio, com um pico entre fevereiro e abril. No sul foi detetado um período mais alargado, de setembro a maio. Sendo que os indivíduos que se reproduzem em setembro são mais jovens, pois os mais velhos estão em repouso nessa altura. Costa (2001) refere nos seus estudos que, nas águas portuguesas em geral, a época de desova corresponde ao período de dezembro a fevereiro. Por outro lado, segundo Gonçalves, Henriques e Angélico (2013), esta época ao largo da Península Ibérica, coincide com os meses de novembro a abril, havendo um pico por volta de janeiro-fevereiro. As fêmeas apresentam nos ovários oócitos que se encontram em todas as fases de desenvolvimento e tamanho, sem que haja uma população dominante. A ovulação de todos os gâmetas não ocorre, por isso, ao mesmo tempo e, como tal, nesse aspeto, trata-se de uma espécie assíncrona, sendo a postura ao longo de várias emissões. Por outro lado, acredita-se que a emissão dos oócitos é sincronizada com a libertação do esperma pelo macho e são obtidos ovos na ordem dos centenas de milhares. Quanto maior for o peso da fêmea, maior é o número de oócitos libertados (Abaunza *et al.*, 2003).

2.1.2. Stocks e capturas

Na zona do Atlântico central e nordeste encontram-se mananciais de 4 espécies do género *Trachurus* com distribuições ligeiramente diferentes mas por vezes coincidentes: carapau (*T. trachurus*), carapau-do-Mediterrâneo (*T. mediterraneus*), carapau-negrão (*T. picturatus*) e carapau-do-Cunene (*T. trecae*). Nesta zona, a espécie mais importante em termos de capturas é *T. trachurus* (Abaunza et al., 2003).

Ora, um *stock* de pescado consiste, biologicamente, no conjunto de todos os indivíduos de uma área que fazem parte do mesmo processo reprodutivo. Por outro lado, por razões de ordem prática, um *stock* pode também ser considerado uma fração da anterior definição, no ponto em que se torna mais fácil para fins da gestão destes recursos em termos de pesca (FAO, 2014b). É, no entanto, um conceito bastante discutível, dado que pode variar segundo o fim que se pretende dar aos dados e a própria base que se tem em conta para os distinguir, como aspetos genéticos, morfométricos, parasitários (nomeadamente anisauquídeos) e traços biológicos como comportamento sexual, distribuição e crescimento (Abaunza et al., 2008). No Atlântico nordeste podem ser assinalados 3 *stocks* de *T. trachurus*: o “*stock* do sul”, que se distribui pelas costas da Península Ibérica, a sul do Cabo Finisterra; o “*stock* do oeste”, com localização na costa oeste da Europa, desde a costa francesa, Ilhas Britânicas, até à Noruega; e um *stock* mais restrito à região do sul da Inglaterra e costa holandesa e dinamarquesa, designado justamente de “*stock* do Mar do Norte” (Abaunza et al., 2008) (Mapa 1).

Mapa 1. Localização dos principais stocks de *T. trachurus* em águas europeias.



Mapa redesenhado a partir de Abaunza et al. (2008).

O maior dos 3 é o “*stock* do oeste” (Abaunza et al., 2003). Mais a sul, já no Atlântico central, o “*stock* do Saara-Mauritânia” caracteriza-se pela elevada taxa de crescimento e fecundidade dos seus indivíduos (Abaunza et al., 2008) e é considerado o maior e mais importante *stock* do oceano Atlântico (Abaunza et al., 2003). No Mar Mediterrâneo existem igualmente 3 *stocks* dignos de registo: um que habita os mares Jónico e Egeu, nas costas

gregas e turcas – “stock mediterrânico do leste” –; um nas águas em torno de Itália, nos mares Adriático e Tirreno – “stock mediterrânico central” –; e outro localizado mais a oeste, nas costas mediterrânicas espanhola e francesa – “stock mediterrânico do oeste” (Mapa 1). A biomassa disponível de um determinado *stock* depende: da taxa de exploração pesqueira e mortalidade natural; do recrutamento de novos indivíduos; e da taxa de crescimento individual (Abaunza *et al.*, 2003).

De acordo com o relatório anual da FAO (2014d), *T. trachurus* não fez parte integrante das 23 espécies mais capturadas mundialmente em 2012. Do mesmo género, apenas o carapau-chileno (*T. murphyi*) das águas do Pacífico, com 447 060 toneladas, figurava no 22º lugar da lista. Ora, nesse período, foram capturadas quase 206 000 toneladas de *T. trachurus* em todo o planeta, menos de metade do verificado em meados da década de 1990. Os países com as maiores capturas registadas foram os Países Baixos (cerca de 78 800 t) e a Irlanda (quase 45 300 t) (FAO, 2014c). Portugal, em 2012, registou valores na ordem das 19 000 toneladas de carapau descarregado (INE, 2013b), pouco mais de 1 000 toneladas acima do que se verificou no ano de 2013 (INE, 2014). Tal como fixado pela legislação comunitária em vigor, atualmente o total admissível de capturas (TAC) para o género *Trachurus* foi estabelecido em 202 140 toneladas no total das zonas de pesca europeias, o que corresponde a uma quota portuguesa de cerca de 28 784 toneladas (Comissão Europeia, 2014). No que diz respeito às artes de pesca praticadas na captura comercial do carapau, pode afirmar-se que são bastante variadas (FAO, 2014c). As que os pescadores portugueses recorrem mais frequentemente são o arrasto e o cerco (INE, 2014). O arrasto pelágico é talvez das artes móveis que permitem obter maiores volumes de captura. Consiste na utilização de um saco de rede em forma de funil, sustentado por dois cabos fixos à embarcação (designada de arrastão), que, por meio de tração mecânica, o puxa ao longo da coluna de água a profundidade calculada, durante uma ou duas horas, findas as quais se procede à recolha do peixe. A rede pode ser içada por estibordo ou por bombordo mas os arrastões estão geralmente munidos de uma rampa na popa, por onde mais eficazmente fazem a recolha do peixe (Bernardo, 2014), com o auxílio de aladores, estropos e guinchos para puxar as redes. A arte de pesca com rede de cerco captura o cardume envolvendo-o por todos os lados exceto por cima, impedindo a sua fuga. As redes, parcialmente flutuantes, são manobradas por um ou dois barcos – traineira e embarcação auxiliar (Alves, 2012). É posta em prática geralmente quando o mar calmo o permite junto à costa. Um exemplo artesanal típico na costa portuguesa é a arte xávega, que se baseia no cerco do peixe com redes que são posteriormente puxadas a partir da praia por meio de tração animal (bois de raça Marinhola), humana ou mecânica (tratores) (Bernardo, 2014). Em Portugal são ainda utilizadas na captura do carapau os aparelhos de anzol e as redes de emalhar (Costa, 2001), constituindo assim a chamada pesca polivalente.

2.1.3. Importância alimentar e económica

Desde tempos imemoriais, o Homem tem incluído o peixe na sua dieta. Os primeiros registos que demonstraram níveis de planeamento e tecnologia marítima complexos o suficiente para permitir a pesca pelágica datam de há cerca de 42 000 anos, encontrados na atual República Democrática de Timor Leste (O'Connor, Ono & Clarkson, 2011). Desde então, o desenvolvimento das artes da pesca e o uso do peixe na alimentação humana foi documentado abundantemente nas principais civilizações mundiais (Bernardo, 2014). Em Portugal, reconhecendo a pesca como um dos mais importantes ramos da indústria nacional, assim como um “*objecto muito digno da sua Real Attenção*” (Anónimo, 1891, p.64), o Príncipe Regente D. João fez publicar, no início do século XIX, vários alvarás onde são tecidas diversas medidas de proteção da faina e das capturas, regulamentando as artes da pesca, com o objetivo claro de conservação dos recursos marinhos.

De facto, quando ainda não era hábito para a maioria da população pobre de Portugal o consumo de carne, já o peixe, encabeçado pelo carapau, assegurava um lugar cimeiro à mesa dos portugueses como uma fonte de proteína animal alternativa (Bernardo, 2014). Aquela espécie é quase tão popular como a sardinha na gastronomia portuguesa (Bernardo, 2013) e reveste-se de uma grande variedade de aplicações práticas. O carapau pode ser utilizado fresco, congelado, salgado seco, fumado ou enlatado e é geralmente confeccionado frito, cozido, grelhado (FAO, 2014c) ou ainda assado (Bernardo, 2013).

Efetivamente, os benefícios nutricionais deste alimento são excecionais. Salvo algumas situações, o peixe apresenta baixos níveis de gorduras saturadas, de hidratos de carbono e de colesterol. A sua proteína é de alto valor dietético e contém diversos micronutrientes essenciais, como as vitaminas A, B e D, minerais que incluem o cálcio, iodo, zinco, ferro e selénio e ainda ácidos gordos ómega-3 poli-insaturados, como os ácidos docosahexaenoico (DHA) e eicosapentaenoico (EPA) (FAO, 2012). Estes compostos têm benefícios singulares a nível cardiovascular, reduzindo o risco de arritmias, baixando a pressão sanguínea e os níveis de triglicéridos, contribuindo para a manutenção do bom funcionamento cardíaco. Como tal, a Associação Americana de Cardiologia (AHA, 2014), aconselha o consumo de peixe, pelo menos, 2 vezes por semana.

Mais concretamente, e do ponto de vista dietético, o carapau é considerado um peixe gordo, uma vez que possui mais de 5% de gordura (Bernardo, 2014) (Tabela 7).

Tabela 7. Composição centesimal do carapau (*T. trachurus*).

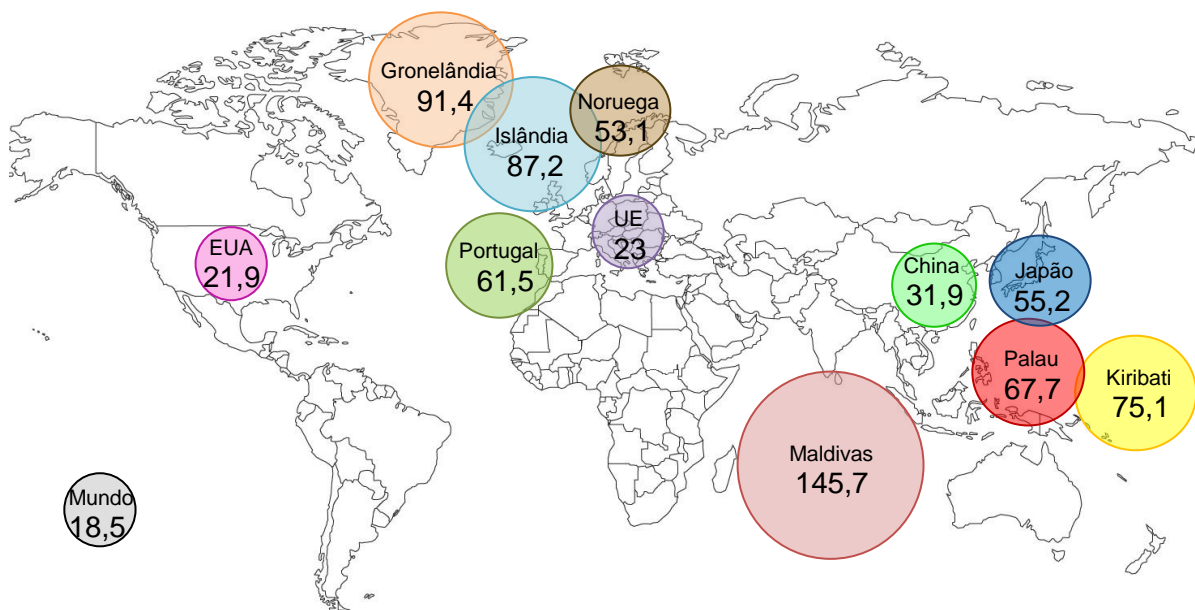
Parâmetro	Teor em 100g do músculo
Água	68 %
Proteína	18,4 %
Gordura	7,4 %
Carboidratos	4,7 %
Cinzas	1,5 %
Energia	158,9 KCal

Adaptado de Udo & Arazu (2011).

Portugal manteve a sua posição de maior consumidor *per capita* de peixe na União Europeia ao longo dos últimos anos. Aumentando de 40 kg, por habitante/ano, em 1983, para 61 kg em 2011, quase o triplo da média comunitária e muito acima de Espanha, que figura no segundo lugar, com cerca de 43 kg/habitante/ano (New Economics Foundation, 2014). Na verdade, no mundo industrializado, só os índices de consumo de pescado do Japão se equiparam com os portugueses, os quais são claramente ultrapassados apenas pelos da Islândia e do território da Gronelândia (FAO, 2012; FAO, 2014). Destacam-se ainda alguns países insulares do Índico e Pacífico como as Maldivas, o Kiribati e o Palau, cujos valores de consumo de pescado, em alguns casos, ultrapassam largamente os dos países ditos desenvolvidos, ou ainda as Regiões Administrativas Especiais de Hong Kong – 71,1 kg/habitante/ano – e Macau – 57,7 kg/habitante/ano – que apresentam valores assinalavelmente distintos do país em que estão inseridos (Répubblica Popular da China) (Fisheries of the United States, 2013) (Mapa 2).

Ressalve-se ainda que a Zona Económica Exclusiva (ZEE) portuguesa está estabelecida em cerca de 1 700 000 km², o que representa um dos mais extensos territórios marinhos da União Europeia (FAO, 2005), depois do Reino Unido e da França, com os seus inúmeros territórios ultramarinos, assim como da Dinamarca que detém a soberania das águas que rodeiam a enorme ilha da Gronelândia. No entanto, e apesar de todos estes fatores, Portugal permanece ainda deficitário no que diz respeito aos produtos da pesca. No período entre 2006 e 2010 o seu grau de auto-suficiência foi de 82%, necessitando, por isso, de recorrer à importação para suprir a procura interna, principalmente a partir de Espanha, com quem estabelece igualmente importantes relações comerciais no que concerne a exportação destes produtos (INE, 2013a). Ainda assim, o preço médio anual do carapau descarregado em Portugal em 2013 foi de 0,92€/kg (INE, 2014), menos 0,41€ que no ano transato e quase metade do verificado em 2011 (INE, 2013b). Ora, estes valores decorrem da sua grande abundância na costa portuguesa, o que torna o carapau (*T. trachurus*) uma das principais espécies capturadas em Portugal.

Mapa 2. Consumo *per capita* de produtos da pesca por território (kg/habitante/ano) – média 2008-2010.



Nota: Os balões correspondentes a cada território não estão desenhados à escala.

Mapa original a partir de dados da Fisheries of the United States (2013).

2.2. Materiais e métodos

2.2.1. Amostragem

No total, foram recolhidos 104 exemplares de carapau, ao longo de 4 semanas, durante os meses de fevereiro e março de 2014, na lota de Peniche. A estrutura da amostra examinada era constituída por 47 peixes machos e 57 fêmeas, sendo a amostragem realizada de forma faseada (em lotes) e aleatória, no início de cada semana, a partir de 4 navios de pesca de arrasto (Tabela 8). O peixe permaneceu, no máximo, 24 horas a bordo dos navios.

Tabela 8. Planificação da amostragem.

Data de colheita	Navio	Lote	Nº de amostras
12 de Fevereiro	“São Gonçálinho”	A	30
17 de Fevereiro	“Veneza”	B	10
	“São Gonçálinho”	C	10
24 de Fevereiro	“Veneza”	D	20
25 de Fevereiro	“Zeus”	E	20
3 de Março	“Nadir”	F	14
			Total: 104

Na sua maioria, as capturas foram efetuadas, ao largo do cabo Carvoeiro. Apenas o último lote teve origem nas águas da região de Aveiro. Como tal, as amostras foram provenientes das águas de Portugal continental, ou seja, da zona FAO 27, sub-área IX, divisão IXa (FAO, 2014a).

2.2.2. Processamento

O processamento das amostras foi efetuado no laboratório da secção de Inspeção Sanitária da FMV-UL, num prazo de 24 a 96 horas após o descarregamento em lota. Todas as amostras estiveram sujeitas a refrigeração desde o momento da captura até ao momento de processamento em laboratório, a uma temperatura próxima da do gelo fundente. Foi atribuído um código alfanumérico a cada uma das amostras de peixe, no qual a letra correspondia ao lote e o algarismo ao número sequencial do indivíduo dentro da amostra. A título de exemplo, o C.8. identificava o oitavo indivíduo do lote C, neste caso correspondente ao grupo recolhido do navio “São Gonçálinho” no dia 17 de fevereiro. Cada exemplar de carapau foi pesado e medido. Na determinação da massa foi utilizada uma balança *Kern PLJ 2100-2M* e o valor foi expresso em grama com duas casas decimais. A medição do comprimento foi efetuada com uma régua. A medida foi registada com uma casa decimal aproximada ao 0,5 centímetro, desde a extremidade cefálica até à caudal, ou seja, o comprimento total.

2.2.2.1. Necrópsia

Em seguida procedeu-se à necrópsia dos carapaus utilizando para isso uma pinça bico-de-pato e uma tesoura, respeitando o seguinte protocolo:

- a. Corte das barbatanas peitorais e ventrais pela base;
- b. Abertura pela “linha branca” efetuando um corte do ânus ao mento;
- c. Corte reto perpendicular ao anterior, da base do opérculo até à linha lateral principal (plano transversal);
- d. Corte reto paralelo ao anterior, do ânus à linha lateral principal (plano transversal);
- e. Corte reto, ao longo da linha lateral principal de modo a permitir destacar a musculatura hipaxial (abas abdominais ou “*belly flaps*”);
- f. Repetição do processo na face contralateral e depósito dos fragmentos de parede abdominal num frasco identificado;
- g. Observação e remoção das vísceras, identificação do sexo – machos com gonadas brancas leitosas, fêmeas com gonadas rosadas ou, no caso das ovas, amareladas – e colocação noutro frasco identificado.

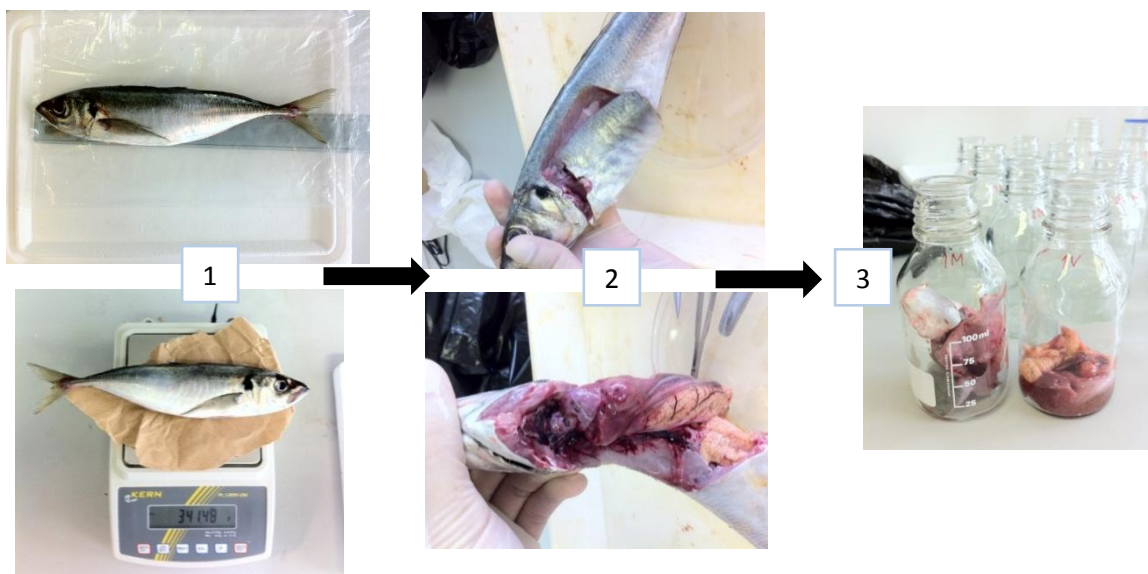
Durante a necrópsia, aquando da manipulação do peixe, foram contabilizadas as larvas de anisaquídeos observáveis à vista desarmada (parasitas “visíveis”) em cerca de 35,58% (37/104) dos carapaus. Para efeitos deste estudo as “vísceras” constituem todos os órgãos abdominais e pélvicos: os digestivos, desde o esófago seccionado a nível do bordo posterior do opérculo até ao ânus, incluindo estômago, intestinos, cecos pilóricos, fígado e pâncreas; aparelho urinário e genital, abrangendo ovas, se fosse caso disso, e ainda bexiga-natatória e báculo. As serosas visceral e parietal foram igualmente analisadas e os anisaquídeos detetados nesta estrutura, ainda que na parede abdominal, foram contabilizados como residentes nas vísceras, exceto se o espécime já estivesse a trespassá-la e a penetrar no músculo. Do mesmo modo, ao conjunto dos músculos, serosas e pele que constituem a parede abdominal foi atribuída a designação de “músculo”. A identificação dos frascos foi feita, por inscrição no vidro com caneta de acetato, do número da amostra seguido da letra M, no caso do músculo, ou V, relativamente às vísceras. Portanto, a cada peixe correspondiam dois frascos (Figura 5).

2.2.2.2. Digestão artificial

Para pesquisa dos anisaquídeos utilizou-se uma técnica destrutiva de digestão artificial que foi realizada em condições que mimetizam o ambiente gástrico do hospedeiro definitivo. O protocolo utilizado foi adaptado do procedimento operacional padrão (SOP) do laboratório de referência da UE para os parasitas (ISS, 2006) e do protocolo utilizado no LI-UT. Como tal, foi preparada uma mistura de pepsina (*Merck 2500 FIP U/g*) – 6 g – com ácido clorídrico – 10 mL –, cloreto de sódio – 8,5 g – e água destilada – 1 000 mL –, num frasco de vidro e o

seu conteúdo foi minuciosamente agitado com uma vareta até estar homogeneizado. Esta foi depois vertida para cada um dos frascos contendo as amostras de modo a que estas ficassem totalmente submersas. Os frascos foram tapados sempre de modo a permitir trocas gasosas e de seguida foram colocados num banho de água a 37°C, no qual permaneceram durante, pelo menos, 15 horas.

Figura 5. Etapas do procedimento de processamento das amostras.



Legenda: 1- medição do comprimento e da massa; 2-necrópsia; 3- preparação para digestão.

2.2.2.3. Recolha dos anisquídeos

Concluído o período de incubação, os frascos com as amostras foram retirados e, um a um, despejados num tabuleiro metálico, onde foi feita uma meticulosa análise com o auxílio de uma lâmpada de luz branca. Por intermédio de água corrente de baixa pressão foi feita uma decantação simples que permitiu remover, de forma grosseira, os detritos mais leves, correspondentes às fibras musculares e outros resíduos tecidulares. As partículas mais pesadas, incluindo as larvas, depositaram-se no fundo do tabuleiro. Os anisquídeos foram recolhidos com uma ansa metálica, contados e limpos de quaisquer restos capsulares com auxílio de lupa. Por fim, foram colocados em tubos “Eppendorf” de 5 mL com álcool a 70%, onde foi feita a identificação do peixe e a zona anatômica (M ou V) de proveniência. Por exemplo, o tubo com a identificação C.8.V dizia respeito aos anisquídeos colhidos das vísceras do oitavo carapau do lote C.

2.2.2.4. Caracterização dos anisaquídeos

No Laboratório de Parasitologia da FMV-UL procedeu-se à identificação dos indivíduos do género *Anisakis* através da observação e medições das respetivas estruturas anatómicas. Os espécimes foram retirados do álcool a 70% e colocados em solução de lactofenol durante, pelo menos, 15 horas. O objetivo deste procedimento foi obter um adequado esclarecimento tendo em vista a observação da sua morfologia interna.

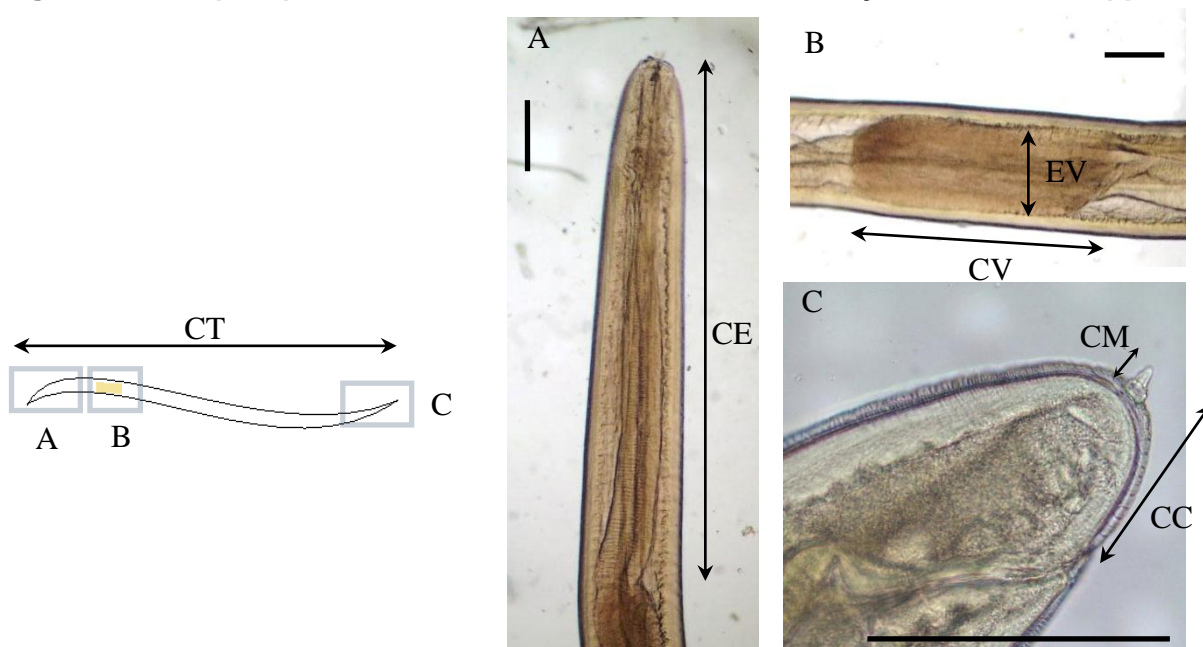
Cada espécime foi depois colocado entre lâmina e lamela com uma gota de solução de lactofenol e observado ao microscópio ótico (*Olympus DP10*, modelo *BX50F*) – ocular com ampliação de 10x e objetiva com ampliação de 4x, 10x ou 20x, consoante a região anatómica. Nas medições foi utilizada uma ocular micrométrica. Para medições da secção anterior e observação geral dos espécimes foi utilizada a objetiva de 4x. Para análise estrutural do ventrículo a objetiva geralmente eleita era a de 10x, enquanto nas medições da extremidade posterior de estruturas mais pequenas, como o *mucron*, era utilizada a objetiva de 20x. Foram tiradas algumas fotografias ilustrativas.

No contexto do presente trabalho apenas foram considerados os exemplares do género *Anisakis*, por isso, apenas foram feitas as medições subsequentes nestas larvas. Como tal, em primeiro lugar foi verificado se o anisaquídeo correspondia ao género *Anisakis* segundo as descrições de Berland (1961), através da observação da forma da cauda e do ventrículo, ausência de apêndice ventricular e ceco intestinal, presença de estriação e conformação da extremidade cefálica. Em seguida, utilizando a ocular biométrica, foram registados os seguintes aspetos morfométricos das larvas do género *Anisakis*: comprimento total (CT), comprimento do esófago (CE), comprimento do ventrículo (CV), espessura do ventrículo (EV), presença ou ausência de *mucron*, comprimento da cauda (CC) e comprimento do *mucron* (CM) (Figura 6). O CT corresponde à medida desde a extremidade anterior à extremidade posterior do parasita. O CE (correspondente ao proventrículo) descreve o comprimento desde a boca até ao limite anterior do ventrículo, e a medida deste ponto ao seu limite posterior corresponde ao CV. A EV diz respeito à secção onde o órgão ventricular atinge a maior largura, enquanto o CC se obtém entre o ânus e a extremidade posterior do corpo. Por fim, o CM representa a distância entre a base e o vértice da espinha caudal ou *mucron*. Importa esclarecer o facto de os acidentes de referência do CC serem variáveis, no ponto em que depende se o *mucron* está ou não presente. Assim, quando existe *mucron* o CC consiste na distância entre o ânus e a extremidade daquele, ou seja, esta medida inclui o próprio CM. Por outro lado, caso esteja ausente, o local mais posterior de referência é o ponto mais caudal do corpo.

Foram também calculadas as proporções das diferentes medidas (CE, CV e CC) em relação ao comprimento total da larva (CT), valores que foram expressos tanto em percentagem como na forma de rácio, para ser possível a comparação com os diversos estudos publicados. % CE/CT, % CV/CT e % CC/CT correspondem, respetivamente, à percentagem

do comprimento total que o esófago, o ventrículo e a cauda representam nas larvas. À semelhança dos anteriores, os parâmetros CT/CE, CT/CV e CT/CC identificam os respectivos rácios. Paralelamente foi ainda determinado um quociente que relaciona as medidas do comprimento e espessura do ventrículo, justamente designado CV/EV.

Figura 6. Principais parâmetros morfométricos na caracterização de *Anisakis* spp.

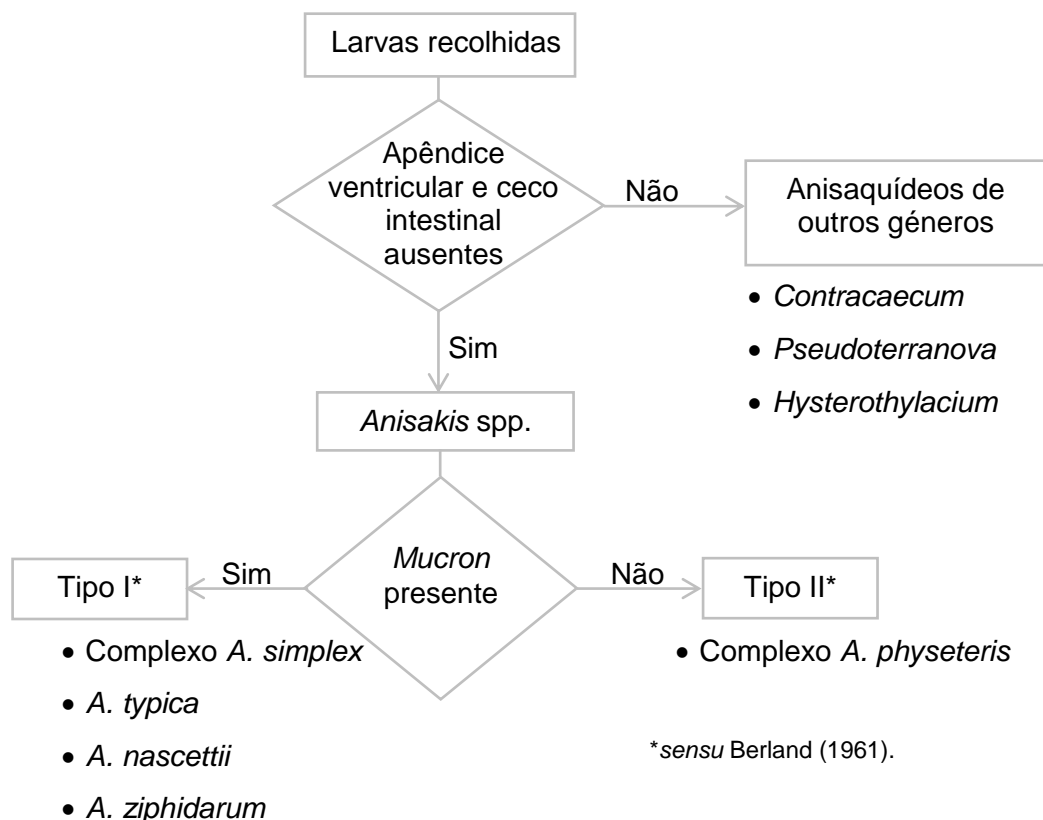


Legenda: A- extremidade anterior; B- porção média; C- extremidade posterior; CT- comprimento total; CE- comprimento do esófago; CV- comprimento do ventrículo; EV- espessura do ventrículo; CC- comprimento da cauda; CM- comprimento do *mucron*. (Barra escala - 160 μ m)

As larvas do género *Anisakis* foram ainda categorizadas em tipo I ou tipo II (*sensu* Berland, 1961). O que os distingue são: o *mucron*, presente nas larvas do tipo I e ausente nas do tipo II; a transição entre o ventrículo e o intestino, oblíqua nas primeiras e perpendicular ao eixo maior do indivíduo nas segundas; e o comprimento do ventrículo, maior no primeiro grupo e mais curto no segundo. No presente estudo, a divisão foi feita com base unicamente na presença ou ausência de *mucron*, pois parece ser a forma mais direta e prática, das anteriormente referidas, de distinguir os dois grupos. O fluxograma de decisão simplificado seguido foi o que se indica no Diagrama 1.

Cada parasita foi identificado com um número, entre parêntesis, posteriormente à classificação alfanumérica anteriormente exposta. Deste modo, o C.8.V(15) corresponde ao décimo quinto nemátode recolhido das vísceras do oitavo carapau proveniente do lote C.

Diagrama 1. Fluxograma simplificado de identificação de *Anisakis* spp.



2.2.2.5. Análise dos dados

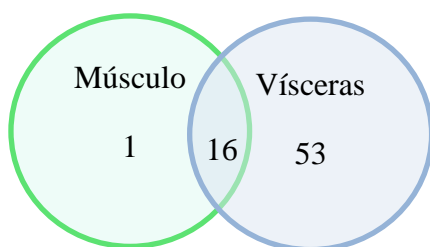
Os resultados obtidos foram processados em *software* Microsoft Excel® 2010, usando também o programa IBM SPSS® Statistics versão 22. Para analisar a relação entre as variáveis peso, comprimento e abundância parasitária foi utilizado o coeficiente de correlação de Spearman. O mesmo teste estatístico foi aplicado igualmente para comparar a abundância de anisquídeos no músculo e nas vísceras. No que concerne a relação entre o sexo do hospedeiro e a sua abundância parasitária foi utilizado o teste Mann-Whitney. Importa esclarecer que a frequência, ou ocorrência, se define como a percentagem de peixes infetados com larvas de anisquídeos. Estas designações correspondem em teoria à prevalência. Outro conceito importante é a intensidade média de parasitismo, que reflete o quociente entre o número total de anisquídeos encontrados e o número total de peixes infetados (Anshary *et al.*, 2014). Por outro lado, considera-se a abundância média como o quociente entre o número total de anisquídeos detetados e o número total de peixes, diferindo da definição anterior ao incluir igualmente os carapaus não infetados (Bush, Lafferty, Lotz & Shostak, 1997). Para as medições morfológicas subsequentes foi utilizado o seguinte critério: as larvas de *Anisakis* intactas recolhidas do músculo foram todas medidas, no entanto, relativamente às formas larvares provenientes das vísceras, dado serem muito numerosas, apenas uma amostra representativa (18,61%) foi caracterizada. A sua seleção foi feita de forma aleatória entre todos os peixes infetados de todos os lotes.

2.3. Resultados

2.3.1. Aspectos quantitativos

Dos 104 carapaus analisados, 70 apresentavam-se parasitados por anisquídeos, o que representa uma ocorrência global de 67,31% (70/104). Dos 47 carapaus machos examinados 31 estavam infetados, o que representa uma ocorrência de 65,96% (31/47), enquanto no grupo das 57 fêmeas existiam 39 indivíduos parasitados, ou seja, a frequência foi de 68,42% (39/57). Do universo considerado, 17 indivíduos continham anisquídeos no músculo e 69 albergavam-nos nas vísceras (Diagrama 2). Como tal, a frequência encontrada foi respetivamente de 16,35% (17/104) e de 66,35% (69/104).

Diagrama 2. Distribuição das amostras positivas a anisquídeos por região anatómica dos carapaus.



No total foram recolhidos 1 504 anisquídeos, dos quais 32 eram provenientes da região muscular – abas abdominais – e 1 472 dos órgãos e serosas abdominais e pélvicos, o que representa 2,13% (32/1504) e 97,87% (1472/1504) respetivamente. Muitas das larvas estavam ainda vivas, movimentando-se no momento em que foram recolhidas. De acordo com o coeficiente de Spearman foi possível constatar uma correlação positiva entre a abundância parasitária nas vísceras e no músculo ($r=0,494$; $n=104$; $p=0,000$). Por outro lado, através do teste Mann-Whitney, verificou-se a ausência de uma evidência estatística que comprovasse que existia uma diferença no número mediano de parasitas num dos sexos ($p=0,430$), ou seja, a abundância parasitária não foi diferente em função do sexo dos peixes. Os carapaus do sexo masculino apresentaram uma abundância média de 12,04 anisquídeos por peixe e uma intensidade média de 18,26 parasitas por hospedeiro infetado. Nas fêmeas esses valores foram, respetivamente, de 16,46 e 24,05. Apenas cerca de 27,14% (19/70) dos anisquídeos recolhidos dos 37 primeiros carapaus correspondiam a parasitas “visíveis”.

Os dados relativos a cada lote constam na tabela 9, incluindo os valores das respetivas ocorrências, intensidades e abundâncias parasitárias médias. Neste contexto, o mínimo foi registado no lote E, com uma positividade de 50% (10/20), no qual, em média, cada carapau infetado possuía 2 anisquídeos e a abundância média era de apenas 1. Por outro lado, tanto o lote C (10/10) como o F (14/14) apresentavam uma ocorrência de 100%. No caso

particular do lote C, em média, cada carapau continha cerca de 75 parasitas, sendo que o hospedeiro mais parasitado albergava 129 nemátodes.

Tabela 9. Frequência, intensidade e abundância do parasitismo nos lotes de carapaus.

Lote	<i>N</i>	<i>n</i>	Comprimento (cm) e peso (g)	Frequência (%)	Intensidade	Abundância
A	30	48	21,18±0,85 (19,50-22,50) 75,99±8,94 (54,19-89,63)	56,67	2,82±2,60 (1-10)	1,60±2,40 (0-10)
B	10	349	25,85±5,32 (19,50-35,00) 155,58±98,64 (56,17-364,40)	70	49,86±58,83 (2-133)	34,90±53,73 (0-133)
C	10	751	36,40±1,71 (34,50-40,00) 443,73±88,49 (350,50-608,52)	100	75,10±43,12 (22-129)	75,10±43,12 (22-129)
D	20	34	21,55±1,28 (20,00-24,00) 80,16±14,74 (58,76-112,36)	60	2,83±1,70 (1-5)	1,70±1,92 (0-5)
E	20	20	20,33±1,09 (18,00-22,00) 64,03±10,08 (44,28-85,19)	50	2,00±1,63 (1-6)	1,00±1,52 (0-6)
F	14	302	32,11±1,52 (28,50-35,00) 302,66±44,06 (197,30-381,58)	100	21,57±9,63 (8-44)	21,57±9,63 (8-44)
Total	104	1504	24,43±5,84 (18,00-40,00) 148,02±131,84 (44,28-608,52)	67,31	21,48±35,21 (1-133)	14,46±30,80 (0-133)

Legenda: *N*- número de carapaus; *n*- número de anisquídeos.

Nos parâmetros “comprimento”, “peso”, “intensidade” e “abundância” os valores expostos correspondem à média, seguida do desvio padrão e, entre parêntesis, ao valor mínimo e ao valor máximo.

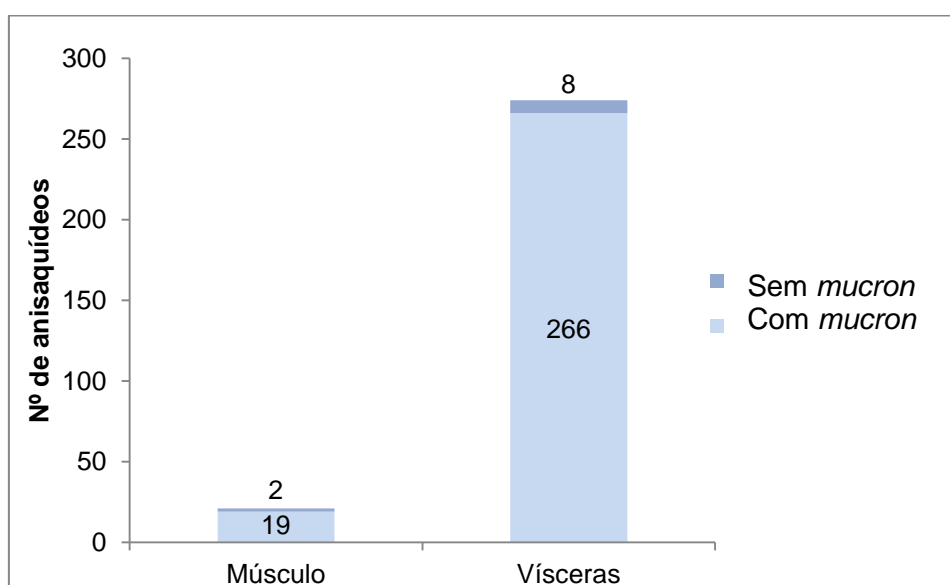
O lote C, apresentando a intensidade e abundância mais elevados, foi também aquele que possuía a média de comprimentos e pesos superior, respectivamente 36,40 cm e 443,73 g. Como tal, de acordo com o teste de Spearman, foi possível confirmar que existia uma correlação positiva expressiva tanto entre o comprimento dos carapaus e a abundância de anisquídeos como entre o peso destes hospedeiros e a sua abundância parasitária (respectivamente: $r=0,782$; $n=104$; $p=0,000$ e $r=0,754$; $n=104$; $p=0,000$).

2.3.2. Aspectos qualitativos

Apenas 21 das 32 larvas recolhidas da musculatura se encontravam intactas e correspondiam a exemplares do género *Anisakis*, ou seja, cerca de 65,63% (21/32). Dos 1472 anisaquídeos removidos das vísceras, apenas 274 foram caracterizados morfologicamente, ou seja, 18,61% (274/1472).

As larvas que pertenciam ao tipo II (*sensu* Berland, 1961), ou seja, aquelas que não apresentavam *mucron* no extremo posterior, representavam 9,52% (2/21) e 2,92% (8/274) dos parasitas recolhidos das massas musculares e das vísceras, respetivamente. Em ambos os grupos a esmagadora maioria era composta por indivíduos do tipo I (*sensu* Berland, 1961), cuja extremidade posterior estava munida de *mucron*. Assim, 90,48% (19/21) das larvas provenientes do músculo e 97,08% (266/274) das originárias das vísceras eram deste tipo (Gráfico 1).

Gráfico 1. Distribuição dos tipos morfológicos das larvas de *Anisakis* spp. (*sensu* Berland, 1961) encontrados em carapau.



Do total de 295 larvas do género *Anisakis* consideradas, independentemente da proveniência, 285 eram do tipo I (*sensu* Berland, 1961), ou seja, 96,61% (285/295), e 10 pertenciam ao tipo II (*sensu* Berland, 1961), o que perfaz 3,39% (10/295). As características morfométricas destes dois grupos encontram-se esquematizadas nas tabelas 10 e 11.

Tabela 10. Parâmetros morfométricos das larvas L3 de *Anisakis* spp. do tipo I (*sensu* Berland, 1961).

Parâmetros morfométricos	Mínimo-Máximo	Média±Desvio Padrão
CT (mm)	6,25-20,88	13,26±2,42
CE (mm)	0,75-2,00	1,37±0,24
CV (mm)	0,25-1,05	0,64±0,13
EV (mm)	0,10-0,30	0,21±0,03
CC (mm)	0,05-0,17	0,12±0,02
CM (μ m)	5,00-35,00	19,65±5,44
% CE/CT	6,84-16,25	10,43±1,58
% CV/CT	2,86-6,90	4,82±0,74
% CC/CT	0,34-1,85	0,90±0,20
CT/CE	6,15-14,62	9,80±1,44
CT/CV	14,50-35,00	21,29±3,52
CT/CC	54,17-297,50	117,15±28,19
CV/EV	1,20-6,00	3,10±0,62

Legenda: CT- comprimento total; CE- comprimento do esôfago; CV- comprimento do ventrículo; EV- espessura do ventrículo; CC- comprimento da cauda; CM- comprimento do *mucron*.

Tabela 11. Parâmetros morfométricos das larvas L3 de *Anisakis* spp. do tipo II (*sensu* Berland, 1961).

Parâmetros morfométricos	Mínimo-Máximo	Média±Desvio Padrão
CT (mm)	8,00-16,00	12,24±2,76
CE (mm)	1,00-1,63	1,32±0,19
CV (mm)	0,43-0,88	0,59±0,13
EV (mm)	0,13-0,25	0,20±0,03
CC (mm)	0,08-0,15	0,10±0,02
% CE/CT	8,74-15,71	11,13±2,52
% CV/CT	3,85-7,14	4,88±0,96
% CC/CT	0,68-1,10	0,86±0,15
CT/CE	6,36-11,44	9,34±1,74
CT/CV	14,00-26,00	21,11±3,54
CT/CC	90,91-147,50	119,17±20,14
CV/EV	2,22-4,38	2,93±0,66

Legenda: CT- comprimento total; CE- comprimento do esôfago; CV- comprimento do ventrículo; EV- espessura do ventrículo; CC- comprimento da cauda.

2.4. Discussão

Apesar dos numerosos trabalhos realizados sobre a ocorrência de *Anisakis* spp. em peixes a nível internacional, são relativamente escassas as publicações que abordem a relação entre os parasitas do género *Anisakis* e o carapau (*Trachurus trachurus*) nas águas ibéricas. Cruz, Vaz e Saraiva (2005), nos seus estudos em exemplares desta espécie provenientes de um mercado na cidade do Porto, concluíram que a ocorrência geral de anisaquídeos era de 38,3%, com uma intensidade média de 2,2 larvas por hospedeiro infetado e uma abundância de 0,84. A frequência de 67,31% sugerida pelo presente estudo está bastante acima do que estes autores propõem, e tanto a intensidade (21,48) como a abundância (14,46) médias são também substancialmente superiores aos valores indicados por aquele trabalho. À semelhança de Cruz *et al.* (2005), também Adroher, Valero, Ruiz-Valero e Iglesias (1996) reportaram uma frequência relativamente inferior em Espanha, onde num mercado de Granada 39,4% dos carapaus examinados estavam parasitados por anisaquídeos. Outros rastreios revelaram positivities mais concordantes com o presente estudo, nomeadamente os de Carvalho-Varela e Cunha-Ferreira (1984), que apontaram frequências de parasitismo de 51,4% em peixes recolhidos em mercados da região de Lisboa, e os de Silva e Eiras (2003), cujas pesquisas em carapau na costa oeste portuguesa encontraram valores de 75,9% de positividade para anisaquídeos. Este último apontou uma intensidade média de infeção de cerca de 6,2 anisaquídeos, ou seja, também bastante abaixo dos 21,48 parasitas/hospedeiro encontrados pelo presente trabalho. Existem ainda publicações nas quais são referidas percentagens de infeção superiores. Borges (2008), numa pesquisa efetuada em carapaus nas lotas de Peniche e Setúbal, concluiu existir uma ocorrência de anisaquídeos de 82,25% e 68,81%, respetivamente, e Sanmartín Durán, Quinteiro e Ubeira (1989) encontraram taxas de positividade de 84,1% em peixes capturados nas águas do noroeste da Península Ibérica. Também Soric, Sequeiros, Miron e Soler (2012), na Galiza, apontaram uma taxa de infeção em *T. trachurus* de 80%, onde a intensidade era de 94,6 e a abundância de 51,73 anisaquídeos por peixe, valores muito acima dos detetados no presente trabalho. Neste último caso os resultados apresentados deveram-se, possivelmente, ao reduzido número de amostras e à grande dimensão dos exemplares, que na sua maioria eram superiores a 28 cm. A grande variação entre os diferentes resultados poderá estar relacionada não só com as distintas zonas de proveniência dos peixes, visto que existem pesqueiros mais ricos que outros em crustáceos (HI) contaminados, como também devido à época do ano considerada, uma vez que os padrões alimentares desta espécie se alteram igualmente com este fator (Cabral & Murta, 2002) assim como os níveis de infeção dos invertebrados da família *Euphausiidae*, tal como citado por Adroher *et al.* (1996). Importa salientar ainda o facto de a maioria dos autores referidos anteriormente ter feito a sua pesquisa ao longo de um período extenso de vários meses (distribuição temporal), ao contrário deste rastreio que decorreu apenas durante

cerca de 4 semanas. Cruz *et al.* (2005), à semelhança desta análise, conseguiram estabelecer uma relação positiva entre as dimensões do carapau e a abundância de anisquídeos. Esta correlação entre comprimento e carga parasitária parece ser lógica no ponto em que quanto maior for o animal, mais idade terá e consequentemente maior será a probabilidade de se ter alimentado durante a sua vida de crustáceos, peixes ou cefalópodes contaminados com formas infetantes L3 de anisquídeos e de estas se terem acumulado nos seus tecidos. Além disso, Cabral e Murta (2002) sugerem que o instinto predatório cresce com a idade do carapau e, deste modo, também a probabilidade de ingestão de presas parasitadas. Esta explicação é também reforçada pela maior probabilidade de contacto com alimento parasitado por parte de um indivíduo que ao longo da sua vida tenha migrado por biomas mais variados, cujo risco de infeção fosse maior. Recorde-se que *T. trachurus* é uma espécie migratória que pode atingir uma longevidade de 40 anos (Abaunza *et al.*, 2003). De facto, no presente estudo foi possível observar que alguns dos indivíduos sujeitos a digestão artificial, particularmente os de maiores dimensões (dados não apresentados), demonstravam no seu conteúdo gástrico concentrações variáveis de crustáceos, possivelmente membros da família *Euphausiidae*, hospedeiros intermediários responsáveis pela transmissão dos parasitas do género *Anisakis*. O lote C, proveniente do navio “São Gonçalinho”, foi aquele cujo conteúdo em anisquídeos foi mais elevado. Note-se que esta amostra representou apenas cerca de 9,62% (10/104) do total de carapaus rastreados mas foi a origem de 49,93% (751/1504) dos anisquídeos deste estudo, ou seja, a décima parte dos hospedeiros continham praticamente metade dos parasitas. Ora, este grupo de carapaus era precisamente aquele cujo conjunto de comprimentos e pesos era superior, variando entre 34,50 cm e 40,00 cm e entre 350,50 g e 608,52 g /exemplar, respetivamente. O lote E, todavia, representava 19,23% (20/104) da amostra total de carapaus e continha somente 1,33% (20/1504) dos anisquídeos. A baixa classe de comprimentos e pesos, respetivamente compreendidos entre 18,00 cm e 22,50 cm e entre 44,28 g e 85,19 g /exemplar, é, mais uma vez, reveladora da correlação positiva entre o comprimento e o peso de *T. trachurus* e a sua abundância em anisquídeos.

Será igualmente relevante constatar que, no decurso do presente estudo, foi feita uma tentativa de recolha de dados com sistema de posicionamento global (GPS) relativamente ao local geográfico exato de proveniência dos lotes de peixe amostrados, a qual se revelou infrutífera, visto que a maioria dos mestres de embarcação se mostrou apreensiva na divulgação rigorosa dos pesqueiros que frequentavam, sendo unicamente indicado, pelos mesmos, uma localização relativa aproximada baseada em pontos orográficos locais.

Tanto Cruz *et al.* (2005) como Carvalho-Varela e Cunha-Ferreira (1984) não detetaram quaisquer formas larvares no músculo dos carapaus que analisaram. Por outro lado, Adroher *et al.* (1996) e Sanmartín Durán *et al.* (1989) assinalaram, respetivamente, que 3,3% e 2,4% dos carapaus por eles examinados continham anisquídeos na musculatura da

parede abdominal. Estes resultados estão abaixo da frequência parasitária muscular indicada no atual trabalho, apesar da utilização de métodos de digestão, por vezes, semelhantes. Importa salientar o facto de, no presente estudo, a digestão artificial do músculo ter sido feita unicamente na região hipaxial abdominal (abas abdominais), ou seja, a frequência parasitária muscular não compreende, na prática, todos os anisauquídeos potencialmente existente na totalidade dos músculos do hospedeiro. Ainda que aquela região anatómica seja reconhecida por albergar a maioria dos anisauquídeos existentes no músculo (Ugland *et al.*, 2004; Berland, 2006; Llarena-Reino *et al.*, 2012), uma vez que o foco original destes parasitas (o tubo digestivo) está em contiguidade com os músculos da parede abdominal, é contudo possível que existam larvas noutras regiões, nomeadamente na musculatura dorsal (EFSA, 2010), que não foram consideradas no delineamento da pesquisa que aqui se apresenta. Este facto permite concluir que a ocorrência parasitária no músculo poderia ter sido superior. Em oposição, e talvez por esse motivo, outros autores como Silva e Eiras (2003) reportaram uma positividade de 54,5% no músculo de *T. trachurus* e indicaram que 41,8% da totalidade dos anisauquídeos recolhidos foram retirados precisamente daquela estrutura (percentagem de parasitas que migraram). Ainda assim, estes valores parecem ser particularmente elevados, uma vez que contrastam incomensuravelmente com os 16,35% de positividade parasitária muscular sugeridos pelo presente trabalho, no qual apenas 2,13% dos anisauquídeos foram recolhidos do músculo. Estas diferenças nos resultados não parecem ter uma justificação clara, além de não ser evidente na pesquisa efetuada por Silva e Eiras (2003) que a migração larvar ocorra efetivamente na fase *post mortem*, tal como sugerem estes autores. Se realmente existe migração *post mortem* nesta espécie, o tempo desde a captura do peixe até ao processamento laboratorial poderá, de certa forma, influenciar os resultados, contudo, na pesquisa supracitada a disseção foi efetuada ainda mais precocemente que no presente rastreio (apenas 24 horas após a captura), o que entra em conflito com as elevadas taxas de parasitismo detetadas no músculo por aqueles autores. Ora, o que é facto é que não existe ainda uma explicação clara e globalmente aceite que elucide sobre os motivos e os mecanismos de migração larvar para o músculo (EFSA, 2010). Na realidade, existem alguns peixes, dentro da mesma espécie e de dimensão semelhante, nos quais essa migração ocorre e noutros não. No presente trabalho os dados sugeriram uma correlação positiva entre a carga parasitária existente nas vísceras e no músculo. Com exceção de 2 dos casos, todos os carapaus parasitados apresentavam um número mais elevado de anisauquídeos nas vísceras do que no músculo e os hospedeiros de maiores dimensões, e por isso mais intensamente parasitados, foram aqueles que geralmente continham proporcionalmente maior quantidade de larvas no músculo. Numa das situações excecionais o único anisauquídeo recolhido estava de facto em transição entre as vísceras e o músculo, com parte do corpo em ambas divisões anatómicas, tendo por isso sido classificado como

pertencente à massa muscular, de acordo com os critérios pré-definidos. Em rigor, podem ser várias as causas que condicionam esta tendência. Por um lado, em circunstâncias normais a deslocação parasitária nesta espécie poderá ser um processo lento e gradual, uma vez que tem origem na infeção larvar do tubo digestivo, passando posteriormente para as vísceras abdominais e apenas por fim, após a perfuração da serosa parietal do mesentério, para as massas musculares. Deste modo, e por razões de ordem anatómica, é mais lógico haver maior número de anisaquídeos nos órgãos integrantes ou adjacentes ao tubo digestivo do que nas massas musculares, fisicamente mais distantes da fonte primária de infeção. Do mesmo modo, é menos provável que um pequeno juvenil acabado de ser infetado apresente, de imediato, formas larvares no músculo. Por outro lado, existe sempre uma variação genética mais ou menos marcada, permitindo, desta forma, flutuações dos mecanismos imunitários individuais dentro do cardume, no qual uns peixes têm maior propensão ao encapsulamento e detenção larvar do que outros. Como tal, apesar de sujeitos às mesmas condições ambientais e alimentares e ainda que apresentem a mesma dimensão e idade, uns hospedeiros teleósteos serão mais propícios a albergar anisaquídeos no músculo que outros. Além disso, parece ainda que a migração para o músculo não está unicamente relacionada com fatores intrínsecos do hospedeiro mas também com características da própria larva do parasita. É sabido que existem espécies do género *Anisakis* muito mais ávidas na deslocação para o músculo do que outras. O exemplo mais evidente é *A. simplex* (s.s.) (Quiazon *et al.*, 2011a; Quiazon *et al.*, 2011b; Romero *et al.*, 2013).

O facto de se encontrarem geralmente encapsuladas (Berland, 2006; EFSA, 2010) parece sugerir que as larvas presentes no músculo tenham efetuado essa migração *ante mortem*, uma vez que apenas em vida teria sido desencadeada uma resposta inflamatória por parte do hospedeiro íctio que originasse esse encapsulamento. É relativamente compreensível que, vendo-se privada do aporte nutritivo aquando da morte do seu hospedeiro, a larva tente deslocar-se para outros locais onde consiga suprir as suas necessidades alimentares, tentando então a migração para o músculo. Opostamente, não é de fácil perceção a vantagem biológica que o parasita encontra, após a morte do seu hospedeiro paraténico íctio, em migrar para a musculatura uma vez que o seu hospedeiro definitivo cetáceo (o qual permite concluir o seu ciclo de vida) ingere o alimento na íntegra, ou seja, vísceras e músculo.

O complexo *Anisakis simplex* é apontado como o conjunto de espécies dominante nas águas temperadas do Atlântico nordeste, pelas quais Portugal é banhado, e está presente na grande maioria das espécies de peixe comercializadas (Abollo, D'Amelio & Pascual, 2001). De facto, de acordo com estudos levados a cabo por Mattiucci *et al.* (2008), existe uma gradação na costa portuguesa em relação ao carapau, onde, à medida que a latitude aumenta, a percentagem relativa de *A. pegreffii* diminui e a de *A. simplex* (s.s.) aumenta

gradualmente. É possível depreender do citado trabalho que no sul do país a frequência de *A. pegreffii* é mais elevada (86,5%) dado a sua proximidade ao Mar Mediterrâneo, onde é maioritária e atinge valores próximos de 100%, sendo gradualmente substituída por *A. simplex* (s.s.), que é a espécie predominante no Atlântico nordeste, à medida que os alvos são peixes que povoam as zonas mais setentrionais. Na região centro de Portugal, local de proveniência das amostras recolhidas no presente estudo, Mattiucci *et al.* (2008) reportaram que 51,4% dos anisacídeos do género *Anisakis* que parasitam carapaus correspondiam à espécie *A. pegreffii* e 48,6% a *A. simplex* (s.s.). Hermida *et al.* (2012), ainda que num estudo em goraz (*Pagellus bogaraveo*), determinaram que, em Peniche, a abundância relativa, em percentagem, do complexo *A. simplex* foi de 97% e apenas 3% correspondiam à espécie *A. ziphidarum*. Este estudo explicita que 48% dos anisacídeos são da espécie *A. pegreffii*, 40% da espécie *A. simplex* (s.s.) e 9% são indivíduos híbridos das duas espécies anteriores. Deste modo, pode-se afirmar que na zona geográfica em questão existe uma clara predominância de espécies cujas larvas pertencem ao tipo I (*sensu* Berland, 1961), na sua esmagadora maioria espécies do complexo *Anisakis simplex*, mais concretamente *A. simplex* (s.s.) e *A. pegreffii*. De facto, a distribuição dos hospedeiros definitivos tem um papel relevante na repartição da frequência dos estádios larvares do próprio parasita. Sabendo que cada espécie do género *Anisakis* tem um grupo de hospedeiros definitivos preferencial específico, é lógico pensar que estes dispersam os ovos do parasita predominantemente pelas zonas que naturalmente habitam, contaminando assim os hospedeiros vertebrados e invertebrados dessa área. Os hospedeiros paraténicos teleósteos e cefalópodes poderão depois migrar para outras regiões geográficas aumentando assim, ainda mais, o espectro de distribuição do parasita. Ora, a costa continental portuguesa constitui o habitat de diversas espécies da família *Delphinidae*, entre as quais a toninha-comum (*Phocoena phocoena*), o golfinho-comum-de-bico-curto (*Delphinus delphis*) e o roaz-corvineiro (*Tursiops truncatus*) (Hammond *et al.*, 2013), precisamente os hospedeiros prediletos das espécies que compõem o complexo *A. simplex* (Hermida *et al.*, 2012). Os resultados do presente trabalho indicam uma maioria expressiva de espécimes do tipo I (*sensu* Berland, 1961), sendo que 96,61% das larvas do género *Anisakis* analisadas apresentavam *mucron*. Este resultado está em consonância com o que foi anteriormente discutido e é, em parte, concordante com os resultados de Mattiucci *et al.* (2008). Estes autores concluíram que os espécimes detetados em *T. trachurus* nesta zona do oceano Atlântico (costa continental central portuguesa) pertenciam todos ao tipo I (*sensu* Berland, 1961), apesar de noutras águas europeias terem sido detetadas pequenas percentagens (1%) de larvas do tipo II (*sensu* Berland, 1961), nomeadamente *A. physeteris* no Mar Tirreno ao largo de Itália. Também Adroher *et al.* (1996) detetaram em Espanha frequências ínfimas, de cerca de 0,23% de *A. physeteris*, em *T. trachurus* proveniente de variadas zonas costeiras como o Mar Cantábrico, o Mar Mediterrâneo e o oceano Atlântico. Estes números estão, ainda assim,

bastante abaixo dos 3,39% de espécimes do tipo II (*sensu* Berland, 1961) aqui apontados. Esta percentagem relativamente elevada de espécimes do tipo II (*sensu* Berland, 1961) pode, na verdade, ter sido influenciada pela metodologia aplicada neste estudo. O atual trabalho apresenta limitações no ponto em que a caracterização efetuada foi unicamente baseada em algumas particularidades morfológicas, visíveis com microscópio ótico, que conduziram grosseiramente apenas ao tipo larvar (*sensu* Berland, 1961). Relembre-se que a caracterização morfológica com vista à classificação dos indivíduos é um desafio que se coloca até para a identificação dos parasitas adultos, cujos acidentes anatómicos taxonomicamente relevantes são, de longe, mais numerosos do que nas formas larvares (Mattiucci & Nascetti, 2008). Dito isto, para aumentar o nível de confiança na identificação das larvas, seria necessário submeter os espécimes colecionados a um exame genético ou bioquímico. Além disso, o acidente anatómico larvar que permitiu categorizá-las em tipo I e tipo II (*sensu* Berland, 1961) foi apenas o *mucron* ou espinha caudal, uma vez que a transição ventrículo-intestinal era, na maior parte das vezes, difícil de observar e dependia do grau de esclarecimento dos espécimes, e os valores de referência dos limites do comprimento do ventrículo eram bastante variáveis consoante a fonte bibliográfica. Não obstante a sua aparente vantagem prática na caracterização larvar, a observação microscópica do *mucron* representou, por vezes, uma tarefa desafiante. Não só pela sua dimensão reduzida (entre 5-35 μm), mas também porque nem sempre era possível observá-lo no plano de visionamento das outras estruturas anatómicas. Ocasionalmente foi necessário a rodagem do espécime e remontagem do mesmo na lâmina para confirmação da ausência do *mucron* em vários planos de observação e focagem. Por outro lado, apesar da limpeza prévia a que as larvas foram sujeitas, a sua porção posterior exibia frequentemente sujidade. A este obstáculo junta-se ainda a possibilidade do espécime estar danificado, tomando-se falaciosamente este artefacto por uma ausência taxonómica de *mucron*. Por outro lado, existe também a possibilidade, ainda que mais remota, de alguns dos indivíduos classificados como tipo II (*sensu* Berland, 1961), devido à ausência de *mucron*, não o apresentarem pois, de facto, podiam não corresponder ao estágio L3, mesmo que representassem efetivamente larvas de *Anisakis* do tipo I (*sensu* Berland, 1961). Todos estes fatores podem ter conduzido, em maior ou menor grau, a resultados inexatos. De qualquer modo, ainda que acima do previsto, a proporção de larvas do tipo II (*sensu* Berland, 1961) é indubitavelmente minoritária no panorama geral considerado (pouco mais de 3%) e a sua baixa concentração no carapau das águas continentais portuguesas pode ser facilmente justificável. Os hospedeiros definitivos das espécies do complexo *A. physeteris*, que possuem larvas do tipo II (*sensu* Berland, 1961), são cachalotes que pertencem às famílias *Physeteridae* e *Kogiidae* (Mattiucci *et al.*, 2001), e habitam geralmente águas profundas bastante abaixo dos 400 m, onde se alimentam principalmente de grandes cefalópodes (National Oceanic and Atmospheric Administration, 2013). Ora,

pode-se considerar que estes cetáceos são, por isso, relativamente incomuns na costa continental portuguesa, o que diminui a dispersão de ovos de *Anisakis* do tipo II (*sensu* Berland, 1961) nestas águas tendencialmente menos profundas. Além disso, pensa-se que os cefalópodes possam representar um papel importante no ciclo biológico das espécies do complexo *A. physeteris*, visto serem o principal alimento dos seus hospedeiros definitivos (Mattiucci *et al.*, 2001), substituindo, quiçá, os peixes teleósteos como hospedeiros paraténicos preferenciais da veiculação. De qualquer modo, a maioria dos hospedeiros teleósteos das espécies do complexo *A. physeteris* habitam principalmente ambientes demersais (Kuhn *et al.*, 2013), o que está de acordo com o habitat dos hospedeiros definitivos e faz supor uma distribuição mais profunda destas espécies parasitárias no oceano. Por todos estes motivos, parece ser pouco provável uma espécie como *T. trachurus* ser contaminada com larvas deste tipo, pois habita preferencialmente a coluna de água bento-pelágica da costa portuguesa a profundidades compreendidas entre os 100 e os 200 metros (FAO, 2014c).

No que diz respeito à morfometria das larvas do tipo I (*sensu* Berland, 1961), pode-se afirmar que os parâmetros que foram mais relevantes, relativamente ao que foi descrito por outros autores (Tabela 12), foram: o comprimento total (CT); o comprimento do esófago (CE) e, em menor grau, o comprimento do ventrículo (CV). A média dos valores do CT das larvas do tipo I (*sensu* Berland, 1961) do género *Anisakis* do atual estudo foi bastante inferior aos valores identificados por outros ensaios. Paradoxalmente, num estudo efetuado por Abollo *et al.* (2001) em *T. trachurus* nas vizinhas águas da Galiza, o valor médio do CT foi quase o dobro do registado no presente rastreio. Efetivamente, o CT de valor mais reduzido detetado neste trabalho (6,25 mm) correspondia a um anisquídeo que, para além disso também revelava os CE, CV e EV de menores dimensões do grupo, respetivamente 0,75 mm, 0,25 mm e 0,10 mm. Mais uma vez, o CE foi também, em termos médios, substancialmente inferior aos valores indicados noutros trabalhos consultados. Ressalva-se aqui o facto de, no caso de Larizza (1995), o valor do CE incluir provavelmente o próprio CV, justificando-se por isso a discrepância com os restantes autores. A média dos valores do CV (0,64 mm), apesar de inferior, aproximou-se mais do número sugerido por Hurst (1984) (0,69 mm) nos seus trabalhos no Pacífico sul, ainda que os valores mínimo e máximo daquela publicação fossem, respetivamente superior e inferior. De facto, se por um lado a diferença verificada em relação aos resultados obtidos na Oceânia pode ser justificada, o mesmo não acontece com a disparidade ocorrida nos estudos realizados na Europa. O desencontro com os resultados de Hurst (1984) pode dever-se tanto a fenómenos de variação geográfica como mesmo à possibilidade de as espécies parasitárias por ele analisadas serem efetivamente diferentes das aqui consideradas. Como se sabe, nas águas do oceano Pacífico sul as espécies de anisquídeos do género *Anisakis* mais frequentes são *A. pegreffii* e *A. berlandi*, enquanto no Atlântico norte se verificam mais frequentemente *A.*

simplex (s.s.) e *A. pegreffii* (Mattiucci *et al.*, 2008; Mattiucci *et al.*, 2014). Esta distinção pode legitimar as diferenças propostas nos estudos daquele autor.

Tabela 12. Comparação dos parâmetros morfométricos das larvas L3 de *Anisakis* spp. do tipo I (*sensu* Berland, 1961) com diferentes autores.

	CT	CE	CV	EV	CC
Hurst, 1984 (Nova Zelândia)	20,30±3,00 (14,00-26,00)	1,99±0,21 (1,57-2,34)	0,69±0,09 (0,47-0,85)		0,12±0,01 (0,09-0,15)
Larizza, 1995 (Itália) ^a	21,60±3,47 (15,00-27,50)	2,65±0,29* (2,06-3,08)	0,70±0,08 (0,59-0,92)	0,24±0,05 (0,15-0,32)	0,11±0,01 (0,09-0,14)
Silva & Eiras, 2003 (Portugal)	24,20 (18,30-28,50)	2,07 (1,30-2,70)	0,82 (0,30-0,90)	0,28 (0,19-0,39)	
Abollo <i>et al.</i> , 2001 (Galiza) ^b	24,21±3,50 (19,48-30,27)	2,25±0,26 (1,86-2,95)	1,02±0,14 (0,79-1,27)	0,21±0,03 (0,15-0,27)	0,14±0,02 (0,10-0,17)
Quiazon <i>et al.</i> , 2008 (Japão) ^c	(11,10-29,94)	(1,04-2,58)	(0,50-1,50)	(0,12-0,31)	(0,04-0,14)
Este estudo (Portugal)	13,26±2,42 (6,25-20,88)	1,37±0,24 (0,75-2,00)	0,64±0,13 (0,25-1,05)	0,21±0,03 (0,10-0,30)	0,12±0,02 (0,05-0,17)

Legenda: CT- comprimento total; CE- comprimento do esófago; CV- comprimento do ventrículo; EV- espessura do ventrículo; CC- comprimento da cauda. ^aValores referentes à espécie *A. pegreffii*; ^bValores referentes à espécie *A. simplex* (s.s.); ^cValores conjugados entre as espécies *A. simplex* (s.s.) e *A. pegreffii*; *Valor do CE provavelmente inclui o ventrículo.

Os valores expostos correspondem à média, seguida do desvio padrão e, entre parêntesis, ao valor mínimo e ao valor máximo, expressos em mm.

Por outro lado, permanece a dúvida sobre os motivos da diferença entre os valores aqui apresentados e os que foram obtidos por Abollo *et al.* (2001) ou mesmo por Silva e Eiras (2003), cujos trabalhos também refletem a realidade das águas ibéricas. É importante relembrar que a morfologia das larvas não permite garantir com segurança a identificação taxonómica destes parasitas (Mattiucci & Nascetti, 2008; Klimpel & Palm, 2011). Tendo em conta estas características, chegou-se genericamente a uma proposta de tipo larvar (*sensu* Berland, 1961). No entanto, relativamente à espécie concreta, apenas é possível conjecturar, com algum grau de probabilidade, que as larvas do tipo I (*sensu* Berland, 1961) aqui recolhidas poderão corresponder a *A. simplex* (s.s.) e *A. pegreffii*, graças aos exaustivos estudos genéticos e bioquímicos conduzidos por autores como Mattiucci *et al.* (2008), Abollo *et al.* (2001) e Hermida *et al.* (2012), entre inúmeros outros rastreios realizados nas águas da costa portuguesa, que dão conta de um predomínio destas espécies. Esta dedução permite comparar, ainda que genericamente, com os resultados morfométricos de autores que consideraram as espécies em pormenor e não apenas o tipo larvar (*sensu* Berland,

1961) que, como se sabe, comporta diversos *taxa*. Quiazon *et al.* (2008) fazem a distinção morfológica entre *A. simplex* (s.s.) e *A. pegreffii* nas águas japonesas, assinalando que o valor do comprimento do ventrículo (CV) é diferente e não coincidente nas duas espécies. Esses autores referem que o ventrículo das larvas L3 de *A. simplex* (s.s.) é consideravelmente maior (0,90-1,50 mm) que o das de *A. pegreffii* (0,50-0,78 mm), permitindo assim distingui-las morfológicamente. Na tabela anterior (tabela 12) esses intervalos de valores limite encontram-se conjugados para permitir a comparação com a população presumidamente mista proposta pelo estudo aqui apresentado. É, no entanto, difícil enquadrar os resultados com os daqueles autores, dado que cerca de 10,53% (30/285) dos indivíduos aqui considerados apresentavam um comprimento do ventrículo (CV) abaixo do limite inferior assinalado por aquele trabalho (<0,5 mm), colocando-os fora do espectro morfológico de ambas as espécies. Mais uma vez pressupõe-se que seja uma diferença derivada da variabilidade geográfica dos parasitas ou mesmo da espécie do hospedeiro que, porventura, poderá influenciar a morfometria dos seus parasitas. Também os comprimentos do *mucron* (CM) registados, em termos médios (19,65 μ m), são ligeiramente inferiores aos 25,69 μ m sugeridos por Larizza (1995) e os 23 μ m propostos por Hurst (1984). O *mucron* mais pequeno que foi medido no atual trabalho tinha 5 μ m, bastante menos do que o indicado por aqueles autores e ainda longe do conjunto de valores avançados por Quiazon *et al.* (2008), compreendidos entre 20-30 μ m, para os indivíduos das espécies *A. simplex* (s.s.) e *A. pegreffii* ao largo do arquipélago nipónico. É pouco provável que as variações, mais ou menos marcadas, aqui discutidas sejam devido a diferenças nos métodos utilizados na fixação dos espécimes e faz supor que, na maioria dos casos, a justificação poderá residir no tipo de hospedeiro teleósteeo considerado ou, possivelmente, na sua dimensão. Ainda assim, os valores dos parâmetros EV e CC parecem ser concordantes com as publicações consideradas, o que faz denotar uma menor variação geral destes critérios anatómicos entre larvas do género *Anisakis* do tipo I (*sensu* Berland, 1961) nas várias zonas do globo e em diversos hospedeiros.

No que concerne a proporção das dimensões das várias estruturas anatómicas (Tabela 13), as diferenças que são mais evidentes são os parâmetros que envolvem o CC, nomeadamente o %CC/CT e CT/CC, respetivamente superior e inferior ao publicado noutros trabalhos. No fundo, estes cálculos permitem concluir que os espécimes aqui analisados têm uma cauda proporcionalmente maior, em relação ao tamanho do corpo quando comparado com os valores encontrados por outros autores para os anisquídeos. Porém, existe uma razão lógica para esta diferença. Se por um lado os valores do CC eram concordantes com os outros ensaios analisados, o mesmo não se pode afirmar relativamente ao CT, uma vez que no presente trabalho estes valores foram bastante inferiores. Como tal, se o comprimento da cauda se mantém e o comprimento total das larvas é consideravelmente inferior, é previsível que o rácio resultante reflita essa diferença.

O comprimento do ventrículo (CV) dos anisquídeos analisados representa perto de 5% do comprimento total dos mesmos (CT), valor que também está ligeiramente acima dos outros trabalhos, que o colocam abaixo dos 3,5%. A justificação para este acontecimento reside também na razão apontada anteriormente.

Tabela 13. Comparação das relações entre os parâmetros morfométricos das larvas L3 de *Anisakis* spp. do tipo I (*sensu* Berland, 1961) com diferentes autores.

	Hurst, 1984 (Nova Zelândia)	Larizza, 1995 (Itália)	Abollo <i>et al.</i> , 2001 (Galiza)	Este estudo (Portugal)
% CE/CT	9,99±1,50	12,5±1,47* (8,96-14,70)		10,43±1,58 (6,84-16,25)
CT/CE		8,15±1,05 (6,80-11,16)	10,87±0,89 (9,79-12,40)	9,80±1,44 (6,15-14,62)
% CV/CT	3,43±0,50	3,30±0,40 (2,84-4,00)		4,82±0,74 (2,86-6,90)
CT/CV			23,69±2,32 (19,98-30,27)	21,29±3,52 (14,50-35,00)
% CC/CT	0,59±0,50	0,52±0,12 (0,35-0,75)		0,90±0,20 (0,34-1,85)
CT/CC		199,93±43,49 (133,30-288,90)	179,35±34,65 (122,71-269,05)	117,15±28,19 (54,17-297,50)

Legenda: CT- comprimento total; CE- comprimento do esófago; CV- comprimento do ventrículo; EV- espessura do ventrículo; CC- comprimento da cauda. *Medida do esófago incluindo o ventrículo.

Os valores expostos correspondem à média, seguida do desvio padrão e, entre parêntesis, ao valor mínimo e ao valor máximo.

Nas larvas do tipo II (*sensu* Berland, 1961) surgiram as mesmas diferenças constatadas anteriormente em termos comparativos (Tabela 14). Neste caso, particularmente o comprimento total das larvas (CT) mas igualmente o comprimento do esófago (CE) e o comprimento da cauda (CC), são consideravelmente inferiores ao observado tanto por Oshima (1972) como por Berland (1961) e, mais recentemente, por Murata *et al.* (2011). Ressalva-se aqui a situação particular de Berland (1961), que apresentando os valores de apenas uma larva (de facto, a descrição literária pioneira deste tipo larvar), não existe grande variabilidade dos resultados, sendo aquelas medidas meramente simbólicas. O CT aqui apresentado (12,24 mm) representa, em termos médios, menos de metade dos valores avançados pelos outros trabalhos (perto de 30 mm). O comprimento do ventrículo (CV), que em média corresponde a 0,59 mm, coincide com o descrito por Murata *et al.* (2011).

Tabela 14. Comparação dos parâmetros morfométricos das larvas L3 de *Anisakis* spp. do tipo II (*sensu* Berland, 1961) com diferentes autores.

	CT	CE	CV	EV	CC
Berland, 1961 (Noruega) ^a	28,4	2,22	0,52		0,18
Oshima, 1972 (Japão)	27,80 (19,00-25,50)	2,73 (2,10-3,42)	0,57 (0,43-0,75)		0,25 (0,18-0,32)
Murata <i>et al.</i> , 2011 (Japão)	29,14±2,29 (22,00-34,50)	2,11±0,17 (1,70-2,40)	0,59±0,06 (0,50-0,72)		0,26±0,05 (0,16-0,38)
Este estudo (Portugal)	12,24±2,76 (8,00-16,00)	1,32±0,19 (1,00-1,63)	0,59±0,13 (0,43-0,88)	0,20±0,03 (0,13-0,25)	0,10±0,02 (0,08-0,15)

Legenda: CT- comprimento total; CE- comprimento do esôfago; CV- comprimento do ventrículo; EV- espessura do ventrículo; CC- comprimento da cauda. ^aValores de uma única larva. Os valores expostos correspondem à média, seguida do desvio padrão e, entre parêntesis, ao valor mínimo e ao valor máximo, expressos em mm.

No que diz respeito aos índices corporais das larvas do tipo II (*sensu* Berland, 1961), visto que o CT foi muito inferior aos trabalhos considerados, também estes se apresentam discrepantes, particularmente o rácio CT/CV (Tabela 15). O CT/CC aproxima-se mais dos valores sugeridos por Murata *et al.* (2011) e substancialmente acima do que foi proposto por Oshima (1972). As justificações propostas para a variação das larvas do tipo I (*sensu* Berland, 1961) são válidas aqui também. Por outro lado, importa salientar que, ao contrário das anteriores, o número de larvas do tipo II (*sensu* Berland, 1961) é muito reduzido, tanto neste estudo como na maioria dos restantes trabalhos consultados, facto que faz ressaltar ainda mais esta variação.

Tabela 15. Comparação das relações entre os parâmetros morfométricos das larvas L3 de *Anisakis* spp. do tipo II (*sensu* Berland, 1961) com diferentes autores.

	Berland, 1961 (Noruega) ^a	Oshima, 1972 (Japão)	Murata <i>et al.</i> , 2011 (Japão)	Este estudo (Portugal)
CT/CE	12,79	10,30 (8,70-11,30)	13,90±1,20 (11,10-17,40)	9,34±1,74 (6,36-11,44)
CT/CV	54,62	49,30 (44,20-57,40)	49,70±4,90 (39,00-62,00)	21,11±3,54 (14,00-26,00)
CT/CC	157,78	86,60 (70,40-123,70)	115,00±23,10 (84,00-171,00)	119,17±20,14 (90,91-147,50)

Legenda: CT- comprimento total; CE- comprimento do esôfago; CV- comprimento do ventrículo; EV- espessura do ventrículo; CC- comprimento da cauda. ^aValores de uma única larva.

Os valores expostos correspondem à média, seguida do desvio padrão e, entre parêntesis, ao valor mínimo e ao valor máximo.

As espécies com o tipo larvar I (*sensu* Berland, 1961) apresentam um ventrículo grande, geralmente mais comprido do que largo enquanto nas do tipo II (*sensu* Berland, 1961) se verifica o oposto (Mattiucci *et al.*, 2005; Mattiucci & Nascetti, 2008). Berland (1961) destacou esta diferença na forma e tamanho do ventrículo como uma das principais características que distingue os dois tipos larvares. Ora, quando se analisa o rácio entre o comprimento e a espessura do ventrículo (CV/EV) de um grupo e de outro, é de esperar que este quociente seja maior nas larvas do tipo I (*sensu* Berland, 1961). No presente estudo este valor foi, em média, de 3,10 nas do tipo I (*sensu* Berland, 1961) e de 2,93 nas larvas do tipo II (*sensu* Berland, 1961). Ainda que pequena a diferença, confirmou-se o postulado anterior. Parece também lógico assumir que o comprimento da cauda (CC) seja maior nas larvas que possuem *mucron*, ou seja, nas do tipo I (*sensu* Berland, 1961). Comparando os dois grupos, é igualmente possível confirmar esta realidade uma vez que as primeiras têm um CC médio de 0,12 mm e as segundas de 0,10 mm. Esta diferença corresponde precisamente à dimensão média do *mucron* evidenciada por esta pesquisa (19,65 μ m, ou seja, praticamente 0,02 mm). Através das medições realizadas é ainda possível chegar a mais um dado relevante para a caracterização morfométrica de forma mais completa das larvas do género *Anisakis* examinadas nesta pesquisa. Tendo em conta que o intestino da larva se estende desde o fim do ventrículo até ao ânus (Berland, 1961; Berland, 2006), pode-se afirmar que, em termos médios, esta estrutura mede cerca de 11,13 mm nas larvas com *mucron* e 10,23 mm naquelas que não o têm. Estes valores foram deduzidos pela subtração das médias do comprimento do esófago (CE), do comprimento do ventrículo (CV) e do comprimento da cauda (CC) ao valor médio do comprimento total (CT), obtendo-se então uma estimativa do comprimento do intestino. Assim sendo, e tal como esperado, este é o mais longo de todos os segmentos do aparelho digestivo destes parasitas.

III. Métodos moleculares aplicados à identificação de anisquídeos

3. Introdução

A identificação das espécies de anisquídeos baseada exclusivamente nos aspetos da morfologia não é suficientemente robusta nem expedita (Mattiucci & Nascetti, 2008). Os elementos morfológicos com interesse taxonómico são, de facto, em número muito reduzido e têm alguma variabilidade individual o que acaba por desvalorizar a sua praticabilidade. Em termos gerais apenas se podem considerar alguns pormenores do aparelho excretor e canal alimentar como relevantes. No macho, além destes acidentes, pode ainda ter-se em atenção o número e disposição das papilas anais e a dimensão das espículas e no caso das fêmeas a posição da vulva. O facto de as várias espécies estarem sujeitas a pressões de seleção semelhantes traduziu-se numa conservação da morfologia, justificável pela co-evolução entre estes nemátodes e o habitat estável representado pelos seus hospedeiros definitivos (Mattiucci & Nascetti, 2008). Estas estruturas anatómicas são observáveis através de microscopia ótica ou eletrónica de varredura mas são unicamente válidas em adultos. Ora, uma vez que são as larvas (L3) que são responsáveis pelos estados patológicos no Homem, surgiu a necessidade gritante de desenvolver técnicas eficientes, para além da morfologia, que permitissem fazer a sua correta identificação (Mattiucci & Nascetti, 2008) e assim implementar melhores estratégias de prevenção, tratamento ou controlo destes agentes zoonóticos (Andrews & Chilton, 1999).

As técnicas moleculares vieram revolucionar definitivamente o estudo destes parasitas, clarificando que, apesar da convergência morfológica de muitos dos anisquídeos, a sua divergência genética e ecológica é notável (Mattiucci & Nascetti, 2008). Atualmente já não há necessidade de proceder à cultura *in vitro* das larvas para posteriormente identificar os adultos, além de que se torna adicionalmente possível identificar formas imaturas mortas recolhidas de seres humanos. MEE, PCR-RFLP, PCR-SSCP e a sequenciação do genoma são alguns dos métodos moleculares que, complementando-se, têm vindo a ser utilizados na identificação de anisquídeos nos últimos anos.

3.1. Eletroforese de enzimas multilocular (MEE)

A eletroforese de enzimas multilocular (MEE ou MLEE), também conhecida por “*multilocus enzyme electrophoresis*”, “*isoenzyme typing*” (Boerlin, 1997), “*allozyme electrophoresis*”, “*alloenzyme electrophoresis*”, “*isozyme electrophoresis*”, “*isoenzyme electrophoresis*” (Andrews & Chilton, 1999) ou ainda “*multilocus allozyme electrophoresis*” (MAE), foi a primeira técnica a ser implementada na identificação de anisquídeos, durante a década de 1980 (Mattiucci & Nascetti, 2008). Baseia-se no princípio da migração de proteínas (enzimas) não desnaturadas através de uma matriz sob a influência de um campo elétrico, ou seja, numa eletroforese em gel (Andrews & Chilton, 1999; Stanley & Wilson, 2003). As

substâncias mais usadas no fabrico do gel são o amido, o acetato de celulose e a poliacrilamida (Boerlin, 1997), sendo a primeira a mais comum (Stanley & Wilson, 2003). O tempo de retenção (R_f) através do gel da eletroforese depende da quantidade, peso molecular e/ou forma das moléculas proteicas (Andrews & Chilton, 1999). Para extrair as enzimas a partir dos tecidos do espécime a analisar pode recorrer-se a diversas técnicas, desde que se conserve a respetiva estrutura original, sendo a sonicação, ou seja, a aplicação de ultra-sons, o método mais usado para o conseguir (Stanley & Wilson, 2003). Uma vez que cada enzima catalisa uma reação bioquímica específica, as bandas da atividade enzimática podem ser facilmente detetadas por pigmentos particulares (Boerlin, 1997; Andrews & Chilton, 1999). De facto, cada proteína pode estabelecer-se em mais do que uma posição migratória no gel, pois na verdade existem diversas formas moleculares da mesma enzima (ou seja, várias isoenzimas). Isto pode ser devido à presença de mais do que um *locus* que codifique essa enzima, à existência de mais do que um alelo num *locus* ou ainda como resultado de modificações translacionais (Andrews & Chilton, 1999). As aloenzimas correspondem às várias formas moleculares de uma enzima derivadas de diferentes alelos no mesmo *locus* segundo um princípio mendeliano, representando um subconjunto das isoenzimas. Algumas das enzimas consideradas no caso dos parasitas do género *Anisakis* são, por exemplo, a aspartato-amino-transferase, a leucina-amino-peptidase e a fosfoglucomutase, entre muitas outras (Mattiucci *et al.*, 2005). Importa igualmente preparar um controlo utilizando os tecidos do próprio hospedeiro, uma vez que é tecnicamente muito complicado obter as proteínas do parasita sem ter associadas algumas do hospedeiro do qual ele foi retirado, para se compararem as bandas obtidas e não haver uma interpretação errónea dos resultados (Endrews & Chilton, 1999). As aloenzimas são marcadores genéticos estáveis presentes em todos os indivíduos de uma população ou espécie de forma semelhante (Andrews & Chilton, 1999). Como tal, foi possível através da MEE caracterizar geneticamente diferentes espécies de anisaquídeos, permitindo a constatação das relações entre elas existentes (Boerlin, 1997; Andrews & Chilton, 1999). Esta técnica possibilitou igualmente a identificação das espécies, inclusivamente em estádios larvares, que como se sabe, não possuem características morfológicas distintivas (Mattiucci & Nascetti, 2008). O facto de ser uma técnica qualitativa baseada na comparação simultânea de amostras impossibilita a confrontação de resultados com outros estudos eletroforéticos independentes com diferentes condições e amostras (Andrews & Chilton, 1999). Por outro lado, a sua principal vantagem é a capacidade de testar o isolamento reprodutivo de populações de anisaquídeos entre grandes números de indivíduos, a partir de amostras congeladas ou frescas de forma fácil, rápida (Mattiucci & Nascetti, 2008) e particularmente económica (Andrews & Chilton, 1999).

3.2. Técnicas baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR)

Todas estas técnicas têm em comum o facto de serem precedidas por um processo de amplificação do material genético através de PCR, após a sua extração do parasita (dissolução química ou física). Em causa podem estar 2 tipos de material genético: o DNA nuclear, existente na região conhecida por espaçador transcrito interno (ITS) (incluindo os genes ITS-1, 5.8S, ITS-2 e 70 pares de bases do gene 28S [ISS, 2013]); ou o DNA mitocondrial (mtDNA), presente nas duas subunidades da citocromo c-oxidase (*cox1* e *cox2*) (D'Amelio *et al.*, 2000; Mattiucci & Nascetti, 2008; Klimpel & Palm, 2011; Murata *et al.*, 2011; Baird *et al.*, 2014). O mtDNA permite inferir unicamente quanto às características genéticas maternas do indivíduo (Zhang & Hewitt, 2003), uma vez que é parte integrante das mitocôndrias e estes organelos celulares estão situados ao nível do citoplasma. No reino animal, salvo raras exceções, durante a fecundação apenas o citoplasma daquele progenitor integra o zigoto. Por outro lado, apesar de amplamente disponível, o DNA nuclear tem também desvantagens importantes. Dado que é proveniente de ambos os progenitores como resultado da fusão dos núcleos dos seus gâmetas, exhibe inconvenientes devido a fenómenos como a recombinação génica e a heterozigotia (Zhang & Hewitt, 2003). Estes dois tipos de DNA devem, por isso, ser usados de forma combinada pois revelam pormenores que se complementam (Zhang & Hewitt, 2003). Comparando com a MEE, estas técnicas têm a vantagem de permitir a utilização tanto de amostras frescas ou congeladas como de espécimes conservados em álcool ou formalina, tendo aumentado a capacidade de estudar a relação filogenética entre espécies baseando-se no conceito de linhagem evolutiva (Mattiucci & Nascetti, 2008).

3.2.1 Polimorfismo de comprimento de fragmentos de restrição (RFLP)

Depois da extração do material genético a partir do espécime e da amplificação da região de DNA de interesse (ITS, *cox1* ou *cox2*) através de iniciadores ("*primers*") e ciclos térmicos específicos (PCR) pode proceder-se então à RFLP. Este método pode ser aplicado a larvas recolhidas de biópsias humanas ou tecidos de origem animal (ISS, 2013) e consiste, em primeiro lugar, na digestão dos produtos do PCR através de enzimas de restrição (Umehara, Kawakami, Araki & Uchida, 2007; Murata *et al.*, 2011; Quiazon *et al.*, 2013; entre outros autores). As enzimas ou endonucleases de restrição são proteínas produzidas por bactérias particulares que reconhecem e cindem regiões específicas do DNA como estratégia defensiva contra vírus bacteriófagos. Existem inúmeras destas moléculas mas as mais comuns nos protocolos de identificação de anisacídeos são as que se indicam na tabela 16.

Tabela 16. Enzimas de restrição mais usadas nos protocolos de PCR-RFLP para identificação de anisquídeos.

Enzima de restrição	Origem	Região de DNA reconhecida e local de cisão
<i>Alu I</i>	<i>Arthrobacter luteus</i>	5'...AGCT...3' 3'...TCGA...5'
<i>Dra I</i>	<i>Deinococcus radiophilus</i>	5'...TTTAAA...3' 3'...AAATTT...5'
<i>EcoR V</i>	<i>Escherichia coli</i>	5'...GATATC...3' 3'...CTATAG...5'
<i>Hae III</i>	<i>Haemophilus aegypticus</i>	5'...GGCC...3' 3'...CCGG...5'
<i>Hha I</i>	<i>Haemophilus haemolyticus</i>	5'...GCGC...3' 3'...CGCG...5'
<i>Hinf I</i>	<i>Haemophilus influenzae</i>	5'...GANTC...3' 3'...CTNAG...5'
<i>Mbo I</i>	<i>Moraxella bovis</i>	5'...GATC...3' 3'...CTAG...5'
<i>Pst I</i>	<i>Providencia stuartii</i>	5'...CTGCAg...3' 3'...GACGTC...5'
<i>Pvu II</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	5'...CAGCTG...3' 3'...GTCGAC...5'
<i>Sca I</i>	<i>Streptomyces caespitosus</i>	5'...AGTACT...3' 3'...TCA_TGA...5'
<i>Taq I</i>	<i>Thermus aquaticus</i>	5'...TCGA...3' 3'...AGCT...5'

Dados do New England Biolabs® Inc., acessível em <https://www.neb.com/products/restriction-endonucleases>

Após a cisão do material genético nas regiões determinadas é feita uma eletroforese para separação e posterior observação das diferentes bandas. Estas bandas representam segmentos de DNA com diferentes dimensões que, sujeitas a um campo elétrico migram proporcionalmente a esse parâmetro. Segmentos com menor peso molecular migram mais pelo gel de agarose e segmentos mais pesados originam bandas mais próximas do pocilho de origem, ou seja que se deslocaram menos. As características do padrão de bandas fluorescentes obtido após a corrida eletroforética são então comparadas com uma chave modelo para as espécies de anisquídeos conhecidas (Figuras 9 e 10).

3.2.2. Polimorfismo de conformação de filamento único (SSCP)

Desenvolvida em 1989, esta é uma técnica indireta versátil e económica (Kourkine, Hestekin & Barron, 2002) que tem como objetivo a identificação de variações nas sequências do DNA que foi amplificado. Tem sido largamente usada na deteção de mutações genéticas em diversos organismos (Bonifácio, Santos, Belo & Cravador, 2001; Westermeier, 2005). Baseia-se no princípio de que uma pequena alteração na sequência de nucleótidos,

causada por uma mutação, afeta a conformação das cadeias simples de DNA (“*single stranded*” ou ssDNA) e consequentemente altera também a sua mobilidade eletroforética (Kourkin *et al.*, 2002). Trata-se de um método indireto uma vez que permite apenas inferir quanto à ocorrência ou não de uma mutação mas é incapaz de detetar a natureza ou localização dessa alteração (Kourkin *et al.*, 2002), tendo eventualmente de ser associado a métodos de sequenciação (Westermeier, 2005). Podem ser usados diversos aditivos que atuam como desnaturantes para facilitar este método, nomeadamente a formamida, a ureia, o dodecil sulfato de sódio (SDS), o polietilenoglicol (PEG) ou o hidróxido de metilmercúrio (Kourkin *et al.*, 2002).

No que diz respeito a identificação de anisaquídeos, esta técnica permite comparar regiões específicas de DNA, no domínio da ITS ou *cox*, de diferentes espécimes, permitindo denotar diferenças e semelhanças de forma a agrupá-los (Mattiucci & Nascetti, 2008).

3.2.3. Sequenciação do material genético

O ilimitado mundo da dupla cadeia de DNA que os investigadores James Watson e Francis Crick começaram por desvendar em 1953 permanece ainda hoje repleto de potencialidades e mistério. Desde essa altura já muito se teorizou e descobriu sobre as suas características e inúmeras aplicações foram desenvolvidas consequentemente à sua sequenciação. Tornar-se-ia bastante fastidioso e algo irrelevante no atual contexto expôr aqui todos os métodos de sequenciação desenvolvidos de forma exaustiva. Como tal, apenas serão brevemente nomeadas algumas destas técnicas consideradas mais relevantes.

Os métodos desenvolvidos por Sanger e Coulton e por Maxam e Gilbert, na década de 1970, constituíram o primeiro passo na sequenciação do DNA (França, Carrilho & Kist, 2002; Westermeier, 2005). Neste tipo de metodologia, que permaneceu uma referência até muito recentemente (Shendure & Ji, 2008), as sequências de nucleótidos são determinadas, após eletroforese, de modo manual ou automático. No primeiro tipo, recorre-se a marcadores radioativos, quimioluminescentes ou à utilização de prata para depois a leitura ser possibilitada por autoradiografia. Na sequenciação automática as amostras com marcadores fluorescentes são lidas por meio de um laser que perscruta o gel, sendo os resultados revelados através de um computador que expõe picos de fluorescência para cada base azotada (adenina, citosina, guanina e timina) (Westermeier, 2005).

Atualmente estão disponíveis diversas tecnologias de próxima geração para sequenciar DNA, conhecidas por “*Next Generation Sequencing techniques*” (NGS) (Shendure & Li, 2008; Bonnet *et al.*, 2014) que têm o potencial de tornar mais célere a pesquisa biológica e biomédica, como é o caso dos métodos microeletroforéticos e a sequenciação por hibridação (Shendure & Li, 2008).

3.3. Descrição do protocolo executado no LI durante o estágio em Tóquio

No decurso do estágio realizado no LI, em Tóquio, houve oportunidade de aplicar várias metodologias para identificação de anisaquídeos, entre as quais um protocolo de identificação genética para aplicação em formas larvares e exemplares adultos do género *Anisakis*, obtidos de hospedeiros paraténicos e definitivos.

3.3.1. Recolha e fixação das amostras

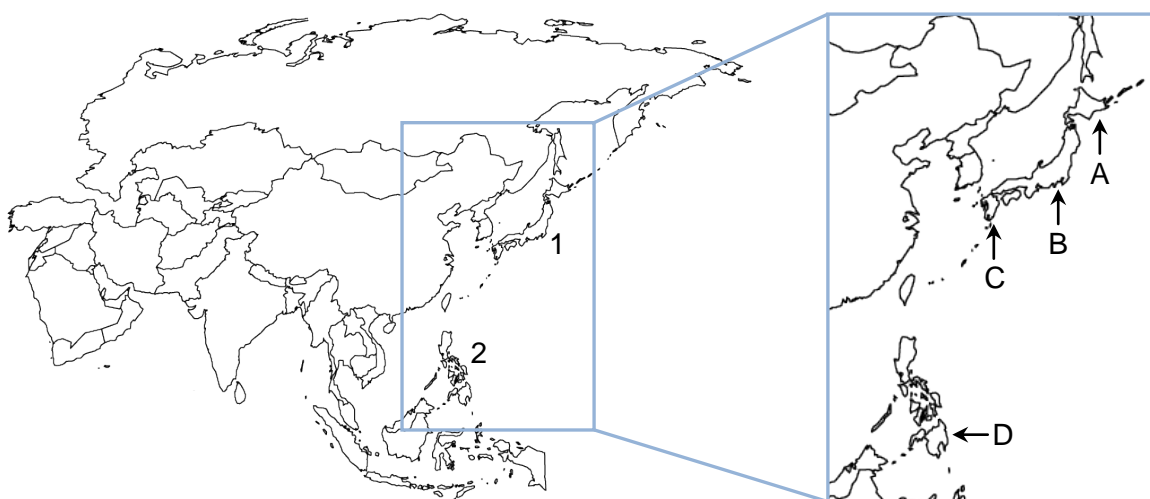
Os exemplares de peixe para obtenção dos parasitas imaturos (L3) foram adquiridos tanto em mercados locais, em Tóquio, como nas regiões de Hokkaido e Kyushu (Mapa 3), e foram sujeitos a necrópsia e digestão artificial dos seus tecidos para recolha das larvas.

Utilizou-se a seguinte fórmula de digestão enzimática:

- 6 g de pepsina porcina;
- 8,5 g de cloreto de sódio;
- 7 mL de ácido clorídrico;
- 1 000 mL de água destilada.

Quanto aos parasitas adultos, estes foram recolhidos previamente, por meio de necrópsia, a partir de cetáceos arrojados ao largo do golfo de Davao, na ilha filipina de Mindanao (Mapa 3).

Mapa 3. Proveniência geográfica das amostras.



Legenda: 1- Japão; 2- Filipinas; A- Ilha de Hokkaido; B- Tóquio; C- Ilha de Kyushu; D- Ilha de Mindanao. (Mapa original)

Cada um dos parasitas foi cortado em 3 porções, uma anterior, uma posterior e uma secção média. As extremidades anteriores e posteriores foram fixadas em etanol a 70%, clarificadas

em glicerol ou lactofenol durante 24 horas e observadas com recurso a microscopia ótica e eletrónica de varredura (SEM). As restantes secções centrais foram fixadas em etanol a 100%.

3.3.2. Extração do DNA e PCR

O DNA foi extraído da porção central de cada exemplar recolhido que se encontrava fixado em etanol a 100% usando o equipamento *QIAamp™ DNA mini Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha) (Figura 7). Em primeiro lugar apreciou-se a região ITS (ITS1 – 5.8s rRNA – ITS2) e só posteriormente se confirmou os resultados obtidos através da análise do DNA mitocondrial na subunidade 2 da citocromo c-oxidase (mtDNA *cox2*).

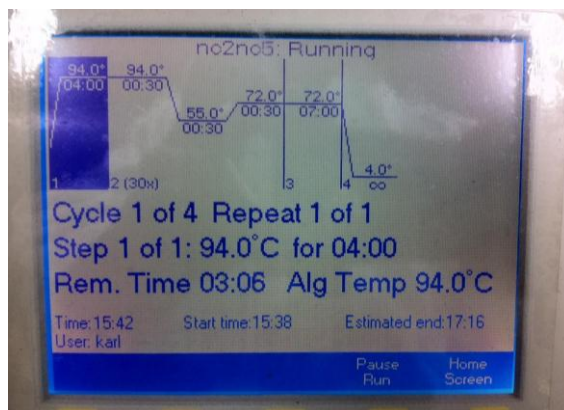
A região ITS foi amplificada usando os “primers” NC5f (5’–GTAGGTGAACCTGCGGAAGGATCATT–3’) e NC2r (5’–TTAGTTTCTTTTCCTCCGCT–3’), um “forward” e um “reverse”, respetivamente, através do protocolo de PCR (Figura 8) seguinte:

- 94°C durante 4 minutos (desnaturação inicial);
- 30 ciclos de:
 - 94°C durante 30 segundos (desnaturação);
 - 55°C durante 30 segundos (hibridização ou “Annealing”);
 - 72°C durante 30 segundos (extensão);
- 72°C durante 7 minutos (extensão final).

Figura 7. *QIAamp™ DNA mini Kit* (Quiagen).



Figura 8. Protocolo de PCR (região ITS).



No que diz respeito a região mtDNA *cox2*, foi amplificada usando os “primers” 210 (5’–CACCAACTCTTAAATTATC–3’) e 211 (5’–TTTCTAGTTATATAGATTGRTTYAT–3’) com o seguinte protocolo de PCR:

- 94°C durante 3 minutos;
- 34 ciclos de:
 - 94°C durante 30 segundos;

- 46°C durante 1 minuto;
- 72°C durante 1 minutos;
- 72°C durante 10 minutos.

Foram usados, em todos os casos, 1 μL de amostra de DNA para um total de 20 μL , em que: 0,6 μL eram de “*forward primer*”; 0,6 μL de “*reverse primer*”; 14,1 μL de água destilada e 3,7 μL de Taq mix (contendo 0,1 μL de TAKARA Ex Taq™ HS; 2 μL de [10x] tampão Ex Taq e 48 μL de mistura dNTP).

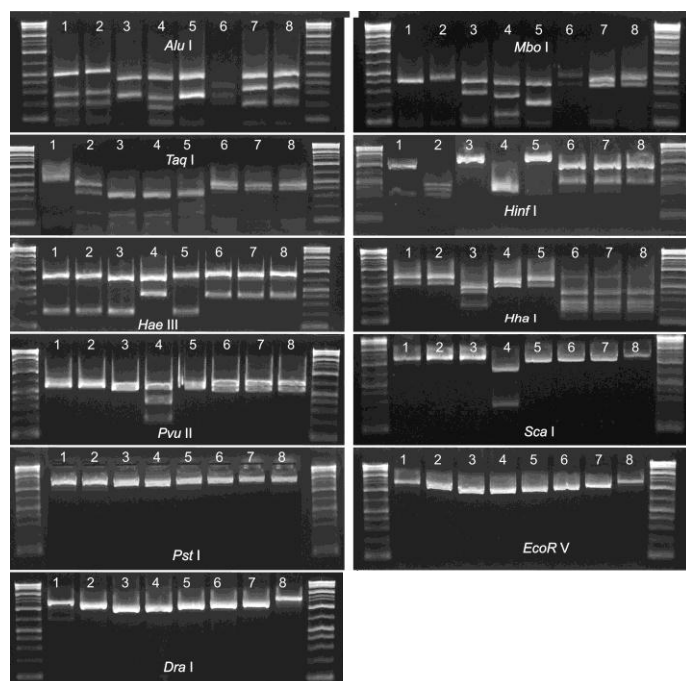
3.3.3. PCR-RFLP e sequenciação de DNA

Nesta fase foram usadas as enzimas de restrição (*Alu* I, *Hae* III, *Hha* I, *Hinf* I, *Mbo* I, *Pvu* II, *Dra* I, *EcoR* V, *Sca* I e *Pst* I [Takara Bio Inc., Otsu, Japão]) (Tabela 13) e compararam-se os padrões com chaves moleculares conhecidas (Figuras 9 e 10). Para tal, os produtos digeridos foram corados com tampão GR (*Green Loading Buffer* – Bio-craft, Tóquio, Japão) e sujeitos a eletroforese com meio de agarose (2%).

Os resultados foram então observados com recurso a iluminação UV (onda curta). Para confirmação dos resultados, o DNA de algumas das amostras foi novamente amplificado (PCR) e sequenciado. Após a amplificação, o gel foi cortado nas bandas de interesse (peso molecular esperado) e o DNA foi purificado através do *Qiaquick™ gel extraction kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha) e sequenciado em ambos os sentidos (“*forward*” e “*reverse*”) usando os mesmos “*primers*” que na PCR.

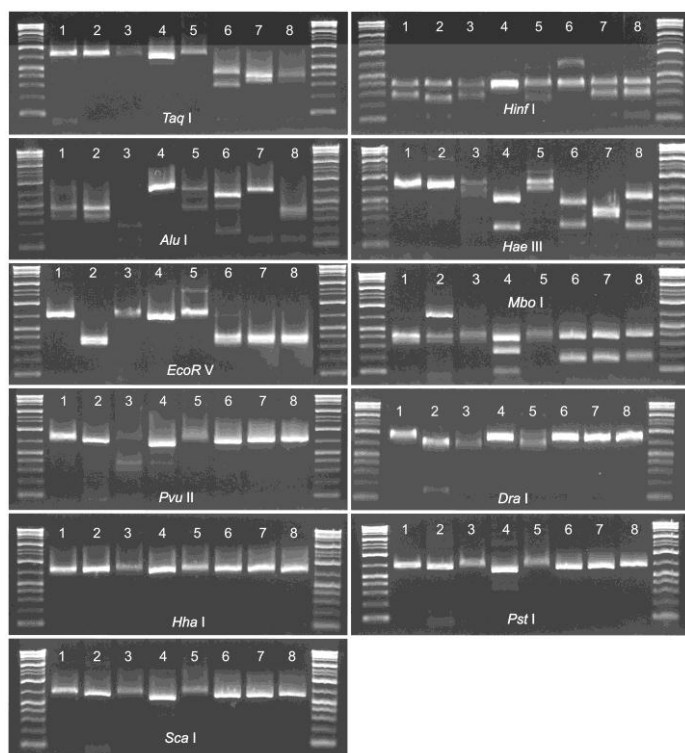
Os resultados foram comparados e alinhados com sequências conhecidas, anteriormente publicadas no GenBank (NCBI). Na posterior edição e análise dos dados utilizaram-se os programas Clustal™X2.1, BioEdit Sequence Alignment Editor™, MEGA™5.2.2, PAUP™4.0 e NEBcutter™V2.0.

Figura 9. Chave molecular para a região ITS usada nos protocolos de identificação de anisacídeos por PCR-RFLP no LI, Tóquio.



Legenda: 1- *A. simplex* (s.s.); 2- *A. pegreffii*; 3- *A. brevispiculata*; 4- *A. ziphidarum*; 5- *A. paggiae*; 6- *A. typica*; 7- *A. typ-like I*; 8- *A. typ-like II*.

Figura 10. Chave molecular para a região *cox2* usada nos protocolos de identificação de anisacídeos por PCR-RFLP no LI, Tóquio.



Legenda: 1- *A. simplex* (s.s.); 2- *A. pegreffii*; 3- *A. brevispiculata*; 4- *A. ziphidarum*; 5- *A. paggiae*; 6- *A. typica*; 7- *A. typ-like I*; 8- *A. typ-like II*.

IV. Conclusões

Em termos gerais pode concluir-se que, na sua larga maioria, os parasitas do género *Anisakis* caracterizados neste rastreio são, de facto, bastante frequentes no carapau e pertencem predominantemente ao tipo I. Ora, estes factos reforçam a ideia da necessidade de se dedicar especial atenção ao risco sanitário dos produtos da pesca, mais concretamente no que concerne o carapau (*T. trachurus*). Esta é umas das espécies mais capturadas em Portugal e bastante popular entre os portugueses que a confeccionam e consomem tendencialmente com as vísceras. A exposição da população nacional ocorre através do contacto (manipulação) e ingestão de exemplares de carapau. Por um lado, a grande capacidade migratória dos anisacídeos do complexo *A. simplex*, especialmente evidente no caso de *A. simplex* (s.s.) poderá significar uma positividade muscular superior (neste caso foi detetada uma frequência de 16,35% no músculo) quando comparando com outras regiões do globo onde estas espécies parasitárias não sejam predominantes. Por outro lado, como foi referido anteriormente, tradicionalmente o carapau não é geralmente eviscerado quando confeccionado grelhado ou assado, sendo comum, nesse caso, o consumo de parte das suas vísceras (nas quais foi detetada uma frequência de anisacídeos de 66,35%) juntamente com as massas musculares. A estes factos acresce o hábito crescente de confeccionar apenas levemente os produtos de origem animal que se tem verificado numa sociedade que despende cada vez menos tempo a cozinhar e na qual cresce significativamente a popularidade dos hábitos de consumo importados da gastronomia oriental, principalmente a japonesa, em que o peixe é servido tendencialmente sem recurso a qualquer processo térmico.

Ora, tendo em conta estes fatores, é possível afirmar que o risco de anisacídose é real e deve ser sempre tido em consideração. Apesar de não ter sido ainda oficialmente reportado em Portugal qualquer caso desta zoonose, não deve ser descartada a possibilidade de efetivamente já ter ocorrido, uma vez que os seus sinais clínicos podem ser negligenciados devido ao facto de serem relativamente passageiros e facilmente confundíveis com outras entidades clínicas mais comuns no nosso país. À ignorância dos consumidores em geral, soma-se algum desconhecimento por parte das autoridades de saúde e classe médica em concreto, geralmente pouco habituados a esta realidade crescente. Por outro lado, existe ainda o risco de alergia ao *A. simplex*, que é igualmente importante e não deve ser olvidado. Ao contrário do que acontece com a infeção parasitária, não existem dispositivos físico-químicos que permitam prevenir a vertente alérgica da doença. Por isso, torna-se particularmente relevante assinalar que, mesmo seguindo as recomendações sanitárias, existe virtualmente sempre a possibilidade de um consumidor sensibilizado desenvolver uma resposta alérgica potencialmente mortal. Por exemplo, mesmo confeccionando o peixe às temperaturas indicadas ou congelando-o previamente de acordo com as medidas

reguladoras europeias, e associando a isso a sua evisceração precoce, continua a existir, em teoria, o risco de um consumidor alérgico sucumbir aos efeitos letais de um ou mais dos 13 alergénios de *A. simplex* conhecidos, potencialmente existentes no músculo do peixe. Este estudo evidenciou que 16,35% dos carapaus se encontravam parasitados no músculo, local onde cerca de 90,48% das larvas eram do tipo I, o que demonstra que esta espécie de peixe representa, de facto, um perigo real para pacientes sensibilizados. Visto não ser sequer necessária a presença física do parasita mas apenas das suas proteínas, as quais são muitas vezes termoestáveis e resistentes à pepsina, para desencadear uma resposta alérgica, torna-se ainda mais difícil controlar este perigo. De facto, a única forma de controlar esta doença até níveis negligenciáveis é através da aquicultura em regime altamente controlado, o que na maioria das espécies de peixe permanece impraticável. Atualmente só se consegue este nível de segurança no salmão-do-Atlântico (*Salmo salar*) criado em jaulas flutuantes ou tanques *on shore*, onde tanto a água como o alimento são exaustivamente controlados. Como tal, em teoria, todos os peixes selvagens representam um risco parasitário considerável.

O presente estudo permitiu ainda determinar que apenas uma percentagem minoritária (cerca de 27,14%) dos anisquídeos são “visíveis” durante a manipulação deste produto da pesca. Pode-se pois afirmar que o Regulamento 853/2004, atualmente em vigor no espaço europeu, é claramente insuficiente no controlo destes parasitas uma vez que faz alusão unicamente aos parasitas visíveis (ponto D, capítulo V, secção VIII). Apenas os produtos da pesca manifestamente parasitados não podem ser colocados no mercado, o que não significa que o peixe e cefalópodes na produção, distribuição e comércio não possam conter parasitas muitas vezes viáveis. Do mesmo modo, atualmente os regulamentos europeus em vigor no âmbito da rotulagem dos géneros alimentícios não protegem o consumidor no que concerne os alergénios de *Anisakis*, apesar de ser reconhecido o seu efeito nefasto por parte das autoridades competentes.

Face ao exposto, e dado que os parasitas do género *Anisakis* são uma realidade incontornável e constante, torna-se premente não incorrer em alarmismos exacerbados mas antes agir de modo a minimizar o seu risco até níveis considerados aceitáveis. Isto pode conseguir-se seguindo as regras sanitárias e medidas preventivas onde se inclui, por exemplo, a congelação a -20°C durante, pelo menos 24 horas, ou o tratamento térmico a 60°C no centro do produto durante, pelo menos, 1 minuto. Se se conseguir inviabilizar as larvas reduz-se imediatamente o risco de anisquiose, uma vez que a possibilidade de ocorrer uma situação de alergia vai sempre teoricamente existir. Por outro lado, é também importante a sensibilização das pessoas através da divulgação de informação acessível e compreensível a todos, assim como a cooperação entre a classe médico-veterinária e a classe médica, entre outras, visto ser este um problema que transpõe a saúde animal, afetando igualmente o ser humano e o ambiente. Este é um tema importante e pertinente

que deverá ser detalhadamente debatido no futuro de forma integrada por várias classes de profissionais, visando uma adequada informação do público em geral.

O conhecimento aprofundado destes parasitas constitui igualmente um meio importante de minimizar os perigos por eles veiculados, e isso passa pela sua correta identificação e caracterização. Foi possível constatar as dificuldades que decorrem da carência ou da insuficiência dos procedimentos laboratoriais que permitam uma identificação inequívoca destes parasitas no que diz respeito às técnicas baseadas em microscopia ótica. De facto, os resultados deste rastreio reforçam, por isso, a ideia da necessidade de, no futuro, serem desenvolvidos recursos capazes de criar maior capacitação laboratorial e especialização no domínio do diagnóstico destes parasitas nos peixes, particularmente a conjugação de técnicas moleculares, e que, em face das novas realidades socio-económicas, parecem ser de premente necessidade e indubitável atualidade.

V. Bibliografia

- Abaunza, P., Gordo, L., Kalou-Riga, C., Murta, A., Eltink, A.T.G.W., García Santamaría, M.T., Zimmermann, C., Hammer, C., Lúcio, P., Iversen, S.A., Molloy, J. & Gallo, E. (2003). Growth and reproduction of horse mackerel, *Trachurus trachurus* (carangidae). *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 13, 27-61.
- Abaunza, P., Murta, A.G., Campbell, N., Cimmaruta, R., Comesaña, A.S., Dahle, G., García Santamaría, M.T., Gordo, L.S., Iversen, S.A., MacKenzie, K., Magoulas, A., Mattiucci, S., I Stransky, C., Zimmermann, C. (2008). Stock identity of horse mackerel (*Trachurus trachurus*) in the Northeast Atlantic and Mediterranean Sea: Integrating the results from different stock identification approaches. *Fisheries Research*, 89, 196-209.
- Abollo, E., D'Amelio, S. & Pascual, S. (2001). Fitness of the marine parasitic nematode *Anisakis simplex* s.str. in temperate waters of the NE Atlantic. *Diseases of Aquatic Organisms*, 45, 131-139.
- Adroher, F.J., Valero, A., Ruiz-Valero, J. & Iglesias, L. (1996). Larval anisakids (Nematoda: Ascaridoidea) in horse mackerel (*Trachurus trachurus*) from the fish market in Granada (Spain). *Parasitology Research*, 82, 253-256.
- AFSSA (2007). Opinion of the French Food Safety Agency (Afssa) on a risk assessment request concerning the presence of anisakidae in the fishery products and the extension of the exemption from the freezing sanitary obligation of the fishery products whose feeding is under control and for certain species of wild fish. Request no. 2007-SA-0379. Maisons-Alfort, France.
- Alves, L.D. (2012). *Sinistralidade na pesca local na região do grande Porto*. Tese apresentada para a obtenção do grau de Mestre. Porto, Portugal: Faculdade de Engenharia - Universidade do Porto, pp. 7-28.
- American Heart Association (AHA) (2014). Fish and Omega-3 Fatty Acids. Acedido em Jun. 11, 2014, em http://www.heart.org/HEARTORG/GettingHealthy/NutritionCenter/HealthyDietGoals/Fish-and-Omega-3-Fatty-Acids_UCM_303248_Article.jsp
- Andrews, R.H. & Chilton, N.B. (1999). Multilocus enzyme electrophoresis: a valuable technique for providing answers to problems in parasite systematics. *International Journal for Parasitology*, 29, 213-253.
- Añibarro, B. & Seoane, F.J. (1998). Occupational conjunctivitis caused by sensitization to *Anisakis simplex*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 102, 331-332.
- Anónimo (1891). 3 de Maio de 1802: Alvará animando a pesca do alto mar e a construção de embarcações próprias para o mesmo fim. In *Collecções de leis sobre a pesca desde Março de 1552 até Janeiro de 1891*. Lisboa, Portugal: Imprensa Nacional, pp. 64-67.
- Anshary, H., Sriwulan, Freeman, M.A. & Ogawa, K. (2014). Occurrence and Molecular Identification of *Anisakis* Dujardin, 1845 from Marine Fish in Southern Makassar Strait, Indonesia. *Korean Journal of Parasitology*, 52(1), 9-19.
- Arias-Díaz, J., Zuloaga, J., Vara, E., Balibrea, J. & Balibrea J.L. (2006). Efficacy of albendazole against *Anisakis simplex* larvae in vitro. *Digestive and Liver Disease*, 38, 24-26.
- Armentia, A., Lombardero, M., Callejo, A., Martín Santos, J.M., Martín Gil, F.J., Veja, J., Arranz, M.L. & Martínez, C. (1998). Environmental and occupational disorders: Occupational asthma by *Anisakis simplex*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 102(5), 831-834.

Armentia, A., Martín-Gil, F.J., Pascual, C., Martín-Esteban, M., Callejo, A. & Martínez, C. (2006). *Anisakis simplex* Allergy After Eating Chicken Meat. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology*, 16(4), 258-263.

ASAE (2014). *Lista de aditivos alimentares*. Acedido em Mai. 28, 2014, em <http://www.asae.pt/>

Audicana, M.T., Ansotegui, I.J., Fernández de Corres, L. & Kennedy, M.W. (2002). *Anisakis simplex* : dangerous - dead and alive?. *Trends in Parasitology*, 18(1), 20-25.

Audicana, M.T. & Kennedy, M.W. (2008). *Anisakis simplex*: from Obscure Infectious Worm to Inducer of Immune Hypersensitivity. *Clinical Microbiology Reviews*, 21(2), 360-379.

Baird, F.J., Gasser, R.B., Jabbar, A. & Lopata, A.L. (2014). Foodborne anisakiasis and allergy. *Molecular and Cellular Probes*, 28(4), 167-174.

Bao, M., Garci, M.E., Antonio, J.M. & Pascual, S. (2013). First report of *Anisakis simplex* (Nematoda, Anisakidae) in the sea lamprey (*Petromyzon marinus*). *Food Control*, 33, 81-86.

Barbarroja-Escudero, J., Rodriguez-Rodriguez, M., Sanchez-Gonzalez, M.J., Antolin-Amerigo, D. & Alvarez-Mon, M. (2013). *Anisakis simplex*: A new etiological agent of Kounis syndrome. *International Journal of Cardiology*, 167, 187-189.

Berland, B. (1961). Nematodes from some Norwegian Marine Fishes. *Sarsia*, 2, 1-50.

Berland, B. (2006). *Musings on Nematode Parasites*. Report for Institute of Marine Research, 11. Bergen, Norway: Biologisk institutt, University of Bergen. pp. 29-33.

Bernardo, F.M.A. (2013). *Inspecção Sanitária de Produtos da Pesca, Ictiologia*. Texto de apoio. Lisboa, Portugal: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.

Bernardo, F.M.A. (2014). *Inspecção veterinária dos produtos da pesca, Os produtos da pesca na alimentação, Ecossistemas e produtividade aquática, Artes da pesca*. Texto de apoio. Lisboa, Portugal: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade de Lisboa.

Boerlin, P. (1997). Applications of multilocus enzyme electrophoresis in medical microbiology. *Journal of Microbiological Methods*, 28, 221-231.

Bonifácio, C., Santos, I.C., Belo, C. & Cravador, A. (2001). Single-Strand Conformational Polymorphism (SSCP) analysis of α S1-casein, β -casein and κ -casein genes in charnequeira Portuguese indigenous goat breed. *Archivos de Zootecnia*, 50, 105-111.

Bonnet, S., Michelet, L., Moutailler, S., Cheval, J., Hébert, C., Vayssier-Taussat, M. & Eloit, M. (2014). Identification of Parasitic Communities within European Ticks Using Next-Generation Sequencing. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 8(3), 1-6.

Borges, S.A.S.L.G. (2008). *Nemátodes da família Anisakidae em peixes de elevado consumo em Portugal e provenientes das lotas de Peniche e de Setúbal: intensidade do parasitismo, prevalência e potencial zoonótico*. Dissertação de Mestrado. Lisboa, Portugal: Faculdade de Medicina Veterinária - Universidade Técnica de Lisboa.

Brutti, A., Rovere, P., Cavallero, S., D'Amelio, S., Danesi, P. & Arcangeli, G. (2010). Inactivation of *Anisakis simplex* larvae in raw fish using high hydrostatic pressure treatments. *Food Control*, 21, 331-333.

- Bush, A.O., Lafferty, K.D., Lotz, J.M. & Shostak, A.W. (1997). Parasitology meets ecology on its own terms: Margolis et al. revisited. *Journal of Parasitology*, 83(4), 575-583.
- Caballero, M.L., Moneo, I., Gómez-Aguado, F., Corcuera, M.T., Casado, I. & Rodríguez-Pérez, R. (2008). Isolation of Ani s 5, an excretory–secretory and highly heat-resistant allergen useful for the diagnosis of Anisakis larvae sensitization. *Parasitology Research*, 103, 1231–1233.
- Caballero, M.L., Umpierrez, A., Moneo, I. & Rodriguez-Perez, R. (2011). Ani s 10, a new *Anisakis simplex* allergen: Cloning and heterologous expression. *Parasitology International*, 60, 209–212.
- Cabral, H.N. & Murta, A.G. (2002). The diet of the blue whiting, horse mackerel and mackerel off Portugal. *Journal of Applied Ichthyology*, 18, 14-23.
- Carvalho-Varela, M. (2005). *Parasitas e Parasitoses em Piscicultura*. Lisboa, Portugal: Ordem dos Médicos Veterinários, pp. 487-497.
- Carvalho-Varela, M. & Cunha-Ferreira, V. (1984). Larva migrans visceral por Anisakis e outros ascarídeos: Helminto zoonoses potenciais por consumo de peixes marinhos em Portugal. *Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias*, 79(472), 299-309.
- Comissão Europeia (2014). TAC e quotas: gestão das unidades populacionais de peixes. Acedido em Jul. 23, 2014, em http://ec.europa.eu/fisheries/cfp/fishing_rules/tacs/index_pt.htm
- Costa, A.M. (2001). *Contribuição do estudo da fecundidade temporal e espacial do carapau (Trachurus trachurus) na costa portuguesa*. Dissertação original apresentada para acesso à Categoria de Investigador Auxiliar. Lisboa, Portugal: IPIMAR.
- Cruz, C. (1988). *Alterações hematológicas, em peixes, provocadas por bactérias, vírus e parasitas*. Trabalho de síntese. Porto, Portugal: Faculdade de ciências, Universidade do Porto.
- Cruz, C., Vaz, A. & Saraiva, A. (2005). Larval anisakids from horse mackerel in Portugal. *Helminthologia*, 42(1), 3-7.
- Dailey, M.D. (2001). Parasitic Diseases. In L.A. Dierauf & F.M.D. Gulland (Eds.), *CRC Handbook of Marine Mammal Medicine*. (2nd ed.). (357-379). Boca Raton, Florida, USA: CRC Press LLC.
- D'Amelio, S., Mathiopoulos, K.D., Santos, C.P., Pugachev, O.N., Webb, S.C., Picanço, M. & Paggi, L. (2000). Genetic markers in ribosomal DNA for the identification of members of the genus *Anisakis* (Nematoda: Ascaridoidea) defined by polymerase chain reaction-based restriction fragment length polymorphism. *International Journal for Parasitology*, 30, 223-226.
- DGAV (2014). *Segurança Alimentar: Parasitas nos produtos da pesca*. Lisboa, Portugal.
- Direção-Geral da Saúde (2012). *Norma nº14/2012, Anafilaxia: Abordagem clínica*. Lisboa, Portugal.
- Eo, K., Yeo, Y. & Kwon, O. (2012). Modified Endoscopic Removal of Foreign Objects from the Forestomach of a Common Bottlenose Dolphin (*Tursiops truncatus*). *Pakistan Veterinary Journal*, 33(2), 251-253.

EFSA (2010). Scientific Opinion on risk assessment of parasites in fishery products. *EFSA Journal*, 8(4), 1-91. Acedido em Mai 12, disponível em <http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1543.pdf>

Evans, D.H. (1998). *The physiology of fishes*. (2nd ed.). Boca Raton, Florida, USA: CRC Press LLC, pp. 283-289.

Falcão, H., Lunet, N., Neves, E., Iglésias, I. & Barros, H. (2008). *Anisakis simplex* as a risk factor for relapsing acute urticaria: a case-control study. *Journal of Epidemiology & Community Health*, 62, 634-637.

Fisheries Agency (2012). *Japan's Fishery at a Glance*, disponível em <http://www.ifa.maff.go.jp/e/>

Fisheries of the United States (2013). *Current Fishery Statistics No. 2012*. Silver Spring, Maryland, USA: Fisheries of the United States.

FAO (2005). Fishery country profile: the Portuguese Republic. Acedido em Jun. 11, 2014, em ftp://ftp.fao.org/FI/DOCUMENT/fcp/en/FI_CP_PT.pdf

FAO (2012). *The State of World Fisheries and Aquaculture: Opportunities and Challenges*. Rome, Italy: FAO.

FAO (2014a). *FAO Major Fishing Areas: Atlantic Northeast (Major Fishing Area 27)*. Acedido em Jun. 13, 2014, em <http://www.fao.org/fishery/area/Area27/en#NAOC68>

FAO (2014b). Fisheries and Aquaculture Department: Defining Fishery Stocks. Acedido em Abr. 9, 2014, disponível em: <http://www.fao.org/fishery/topic/14787/en>

FAO (2014c). Fisheries and Aquaculture Department: Species Fact Sheets *Trachurus trachurus*. Acedido em Mar. 25, 2014, em <http://www.fao.org/fishery/species/2306/en>

FAO (2014d). *The State of World Fisheries and Aquaculture: Opportunities and Challenges*. Rome, Italy: FAO.

FDA (2011). *Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance - Chapter 5* (4th ed). Silver Spring, Maryland, USA: FDA Office of Seafood. pp. 91-98.

França, L.T.C., Carrilho, E. & Kist, T.B.L. (2002). A review of DNA sequencing techniques. *Quarterly Reviews of Biophysics*, 35 (2), 169-200.

Giarratana, F., Muscolino, D., Beninati, C., Giuffrida, A. & Panebianco, A. (2014). Activity of *Thymus vulgaris* essential oil against *Anisakis* larvae. *Experimental Parasitology*, 142, 7-10.

Gonçalves, P., Henriques, E., Angélico, M.M. (2013). Co-occurrence of *Trachurus trachurus* and *Trachurus picturatus* spawners in Atlantic Iberian waters and the ability to distinguish their eggs in plankton samples. *Fisheries research*, 138, 139-145.

Hammond, P.S., Macleod, K., Berggren, P., Borchers, D.L., Burt, L., Cañadas, A., Desportes, G., Donovan, G.P., Gilles, A., Gillespie, D., Gordon, J., Hiby, L., Kuklik, I., Leaper, R., Lehnert, K., Leopold, M., Lovell, P., Øien, N., Paxton, C.G.M., Ridoux, V., Rogan, E., Samarra, F., Scheidat, M., Sequeira, M., Siebert, U., Skov, H., Swift, R., Tasker, M.L., Teilmann, J., Van Canneyt, O. & Vásquez, J.A. (2013). Cetacean abundance and distribution in European Atlantic shelf waters to inform conservation and management. *Biologic Conservation*, 164, 107-122.

- Hermida, M., Mota, R., Pacheco, C.C., Santos, C.L., Cruz, C., Saraiva, A. & Tamagnini, P. (2012). Infection levels and diversity of anisakid nematodes in blackspot seabream, *Pagellus bogaraveo*, from Portuguese waters. *Parasitology Research*, 110, 1919–1928.
- Herrero, B., Vieites, J.M., Espiñeira, M. (2011). Detection of anisakids in fish and seafood products by real-time PCR. *Food Control*, 22, 933-939.
- Hochberg, N.S. & Hamer, D.H. (2010). Anisakidosis: Perils of the Deep. *Clinical Infectious Diseases*, 51(7), 806–812.
- Huh, S., Sohn, W.M. & Chai, J.Y. (1993). Intestinal parasites of cats purchased in Seoul. *The Korean Journal of Parasitology*, 31(4), 371-373.
- Hurst, R.J. (1984). Identification and description of larval *Anisakis simplex* and *Pseudoterranova decipiens* (Anisakidae: Nematoda) from New Zealand waters. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research*, 18(2), 177-186.
- INE (2013a). *Abastecimento Alimentar em Portugal*. Lisboa, Portugal: INE, I.P.
- INE (2013b). *Estatísticas da pesca 2012*. Lisboa, Portugal: INE, I.P.
- INE (2014). *Estatísticas da pesca 2013*. Lisboa, Portugal: INE, I.P.
- ISS (2006). Artificial Digestion of Fish Fillets for the Isolation of Anisakidae and Opisthorchidae Larval Stages: Standard Operating Procedure (SOP). Acedido em Jan. 23, 2014, em http://www.iss.it/binary/crlp/cont/SOP_Artificial_digestion_of_fish_fillet.pdf
- ISS (2013). Identification of *Anisakidae* Larvae at the species level by PCR/RFLP. Acedido em Jul. 12, em http://www.iss.it/binary/crlp/cont/MI_04_website_EN.pdf
- Integrated Taxonomic Information System (2014). ITIS report: *Trachurus trachurus*. Acedido em Jun. 5, 2014, em: http://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=168588
- Karl, H., Baumann, F., Ostermeyer, U., Kuhn, T. & Klimpel, S. (2011). *Anisakis simplex* (s.s.) larvae in wild Alaska salmon: no indication of post-mortem migration from viscera into flesh. *Diseases of Aquatic Organisms*, 94, 201–209.
- Klimpel, S., Kuhn, T., Busch, M.W., Karl, H. & Palm, H.W. (2011). Deep-water life cycle of *Anisakis paggiae* (Nematoda: Anisakidae) in the Irminger Sea indicates kogiid whale distribution in north Atlantic waters. *Polar Biology*, 34, 899–906.
- Klimpel, S. & Palm, H.W. (2011). Anisakid Nematode (Ascaridoidea) Life Cycles and Distribution: Increasing Zoonotic Potential in the Time of Climate Change?. In H. Mehlhorn (Ed.), *Parasitology Research Monographs 2: Progress in Parasitology* (pp. 201-222). Heidelberg, Germany: Springer.
- Knoff, M., de São Clemente, S.C., Pinto, R.M. & Gomes, D.C. (2001). Nematodes of Elasmobranch Fishes from the Southern Coast of Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 96 (1), 81-87.
- Kourkine, I.V., Hestekin, C.N. & Barron, A.E. (2002). Technical challenges in applying capillary electrophoresis-single strand conformation polymorphism for routine genetic analysis. *Electrophoresis*, 23, 1375-1385.

- Køie, M., Berland, B. & Burt, M.D.B. (1995). Development to third-stage larvae occurs in the eggs of *Anisakis simplex* and *Pseudoterranova decipiens* (Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52(1), 134-139.
- Kuehn, A., Swoboda, I., Arumugam, K., Hilger, C. & Hentges, F. (2014). Fish allergens at a glance: variable allergenicity of parvalbumins, the major fish allergens. *Frontiers in Immunology*, 5 (179), 1-8.
- Kuhn, T., García-Màrquez, J. & Klimpel, S. (2011). Adaptive Radiation within Marine Anisakid Nematodes: A Zoogeographical Modeling of Cosmopolitan, Zoonotic Parasites. *PLoS ONE*, 6(12), 1-6.
- Kuhn, T., Hailer, F., Palm, H.W. & Klimpel, S. (2013). Global assessment of molecularly identified *Anisakis* Dujardin, 1845 (Nematoda: Anisakidae) in their teleost intermediate hosts. *Folia Parasitologica*, 60 (2), 123-134.
- Larizza, A. & Vovlas, N. (1995). Morphological Observations on Third-Stage Larvae of *Anisakis simplex* A (Anisakidae: Nematoda) from Adriatic and Ionian Waters. *Journal of the Helminthological Society of Washington*, 62(2), 260-264.
- Lehner, K., Raga, J.A. & Siebert, U. (2005). Macroparasites in stranded and bycaught harbor porpoises from German and Norwegian waters. *Diseases of Aquatic Organisms*, 64, 265-269.
- Llarena-Reino, M., González, A.F., Vello, C., Outeiriño, L. & Pascual, S. (2012). The accuracy of visual inspection for preventing risk of *Anisakis* spp. infection in unprocessed fish. *Food Control*, 23(1), 54-58.
- Mattiucci, S., Paggi, L., Nascetti, G., Abollo, E., Webb, S.C., Pascual, S., Cianchi, R. & Bullini, L. (2001). Genetic divergence and reproductive isolation between *Anisakis brevispiculata* and *Anisakis physeteris* (Nematoda: Anisakidae)s. *International Journal for Parasitology*, 31, 9-14.
- Mattiucci, S., Nascetti, G., Dailey, M., Webb, S.C., Barros, N.B., Cianchi, R. & Bullini, L. (2005). Evidence for a new species of *Anisakis* Dujardin, 1845: morphological description and genetic relationships between congeners (Nematoda: Anisakidae). *Systematic Parasitology*, 61, 157-171.
- Mattiucci, S., Farina, V., Campbell, N., MacKenzie, K., Ramos, P., Pinto, A.L., Abaunza, P. & Nascetti, G. (2008). *Anisakis* spp. larvae (Nematoda: Anisakidae) from Atlantic horse mackerel: Their genetic identification and use as biological tags for host stock characterization. *Fisheries Research*, 89, 146-151.
- Mattiucci, S. & Nascetti, G. (2008). Advances and Trends in the Molecular Systematics of Anisakid Nematodes, with Implications for their Evolutionary Ecology and Host Parasite Co-evolutionary Processes. In D. Rollinson & S.I. Hay (Eds.), *Advances in Parasitology*, Volume 66. (pp. 47-148). Amsterdam, Netherlands: Elsevier Ltd. Academic Press.
- Mattiucci, S., Paoletti, M. & Webb, S.C. (2009). *Anisakis nascettii* n. sp. (Nematoda: Anisakidae) from beaked whales of the southern hemisphere: morphological description, genetic relationships between congeners and ecological data. *Systematic Parasitology*, 74, 199-217.
- Mattiucci, S., Cipriani, P., Webb, S.C., Paoletti, M., Marcer, F., Bellisario, B., Gibson, D.I. & Nascetti, G. (2014). Genetic and morphological approaches distinguish the three sibling species of the *Anisakis simplex* species complex, with a species designation as *Anisakis*

- berlandi* n. sp. for *A. simplex* sp. C (Nematoda: Anisakidae). *Journal of Parasitology*, 100(2), 199-214.
- Molnár, K., Buchmann, K. & Székely, C. (2006). Phylum Nematoda. In P.T.K. Woo (Ed.), *Fish Diseases and Disorders, Volume 1: Protozoan and Metazoan Infections*. (2nd Ed.). (417-443). Wallingford, Oxfordshire, UK: CABI.
- Moneo, I., Caballero, M.L., González-Muñoz, M., Rodríguez-Mahillo, A.I., Rodríguez-Perez, R. & Silva, A. (2005). Isolation of a heat-resistant allergen from the fish parasite *Anisakis simplex*. *Parasitological Research*, 96, 285-289.
- Moneo, I., Caballero, M.L., Rodríguez-Perez, R., Rodríguez-Mahillo, A.I. & González-Muñoz, M. (2007). Sensitization to the fish parasite *Anisakis simplex*: clinical and laboratory aspects. *Parasitological Research*, 101, 1051-1055.
- Moravec, F. (1994). *Parasitic Nematodes of Freshwater Fishes of Europe*. Dordrecht, Netherlands: Kluwer Academic Publishers, pp. 386-404.
- Murata, R., Suzuki, J., Sadamasu, K. & Kai, A. (2011). Morphological and molecular characterization of *Anisakis* larvae (Nematoda: Anisakidae) in *Beryx splendens* from Japanese waters. *Parasitology International*, 60, 193-198.
- Murta, A.G., Abaunza, P., Cardador, F. & Sánchez, F. (2008). Ontogenic migrations of horse mackerel along the Iberian coast. *Fisheries Research*, 89, 186-195.
- National Oceanic and Atmospheric Administration (2013). *NOAA Fisheries Office of Protected Resources: Sperm Whales (Physeter macrocephalus)*. Acedido em Jul. 4, 2014, em <http://www.nmfs.noaa.gov/pr/species/mammals/cetaceans/spermwhale.htm>
- New Economics Foundation (2014). *Fish dependence - 2014 update: the reliance of the EU in fish from elsewhere*. London, UK: nef.
- Nieuwenhuizen, N., Lopata, A.L., Jeebhay, M.F., Herbert, D.R., Robins, T.G. & Brombacher, F. (2006). Food allergy, dermatologic diseases, and anaphylaxis: Exposure to the fish parasite *Anisakis* causes allergic airway hyperreactivity and dermatitis. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117(5), 1098-1105.
- Noguera, P., Collins, C., Bruno, D., Pert, C., Turnbull, A., MacIntosh, A., Lester, K., Bricknell, I., Wallace, S. & Cook, P. (2009). Red vent syndrome in wild Atlantic salmon *Salmo salar* in Scotland is associated with *Anisakis simplex* sensu stricto (Nematoda: Anisakidae). *Diseases of Aquatic Organisms*, 87, 199-215.
- Nunes, C., Ladeira, S. & Mergulhão, A. (2003). Alergia ao *Anisakis simplex* na população portuguesa. *Revista Portuguesa de Imunoalergologia*, XI, 30-40.
- O'Connor, S., Ono, R. & Clarkson, C. (2011). Pelagic Fishing at 42,000 Years Before the Present and the Maritime Skills of Modern Humans. *Science*, 334, 1117-1121.
- Oshima, T. (1972). *Anisakis* and anisakiasis in Japan and adjacent areas. *Progress of Medical Parasitology in Japan*, 4, 305-393.
- Pacios, E., Arias-Díaz, J., Zuloaga, J., Gonzalez-Armengol, J., Villarroel, P. & Balibrea (2005). Albendazole for the Treatment of Anisakiasis Ileus. *Clinical Infectious Diseases*, 41, 1825-1826.

Petrie, A., Wootten, R., Bruno, D., MacKenzie, K. & Bron, J. (2007). *A Survey of Anisakis and Pseudoterranova in Scottish fisheries and the efficacy of current detection methods*. Report of Food Standard Agency, FSAS Project S14008. Stirling, Scotland, UK. pp. 1-16.

Pontes, T., D'Amelio, S., Costa, G. & Paggi, L. (2005). Molecular Characterization of Larval Anisakid Nematodes from Marine Fishes of Madeira by a PCR-based Approach, with Evidence for a New Species. *Journal of Parasitology*, 91(6), 1430-1434.

Quiazon, K.M.A., Yoshinaga, T., Ogawa, K. & Yukami, R. (2008). Morphological differences between larvae and in vitro-cultured adults of *Anisakis simplex* (*sensu stricto*) and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae). *Parasitology International*, 57, 483-489.

Quiazon, K.M.A., Yoshinaga, T., Santos, M.D. & Ogawa, K. (2009). Identification of Larval *Anisakis* spp. (Nematoda: Anisakidae) in Alaska Pollock (*Theragra chalcogramma*) in Northern Japan Using Morphological and Molecular Markers. *Journal of Parasitology*, 95(5), 1227-1232.

Quiazon, K.M.A., Yoshinaga, T. & Ogawa, K. (2011a). Distribution of *Anisakis* species larvae from fishes of the Japanese waters. *Parasitology International*, 60, 223-226.

Quiazon, K.M.A., Yoshinaga, T. & Ogawa, K. (2011b). Experimental challenge of *Anisakis simplex sensu stricto* and *Anisakis pegreffii* (Nematoda: Anisakidae) in rainbow trout and olive flounder. *Parasitology International*, 60, 126-131.

Quiazon, K.M.A., Santos, M.D. & Yoshinaga, T. (2013). *Anisakis* species (Nematoda: Anisakidae) of Dwarf Sperm Whale *Kogia sima* (Owen, 1866) stranded off the Pacific coast of southern Philippine archipelago. *Veterinary Parasitology*, 197, 221-230.

Quiazon, K.M.A., Zenke, K. & Yoshinaga, T. (2013). Molecular characterization and comparison of four *Anisakis* allergens between *Anisakis simplex sensu stricto* and *Anisakis pegreffii* from Japan. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 190, 23-26.

Raamat, K. (2012). *Nematode infestation in flatfish in the outer Oslofjord*. Master thesis. Oslo, Norway: Department of Biology, University of Oslo.

Regulamento (CE) nº853/2004 de 29 de Abril de 2004. Jornal Oficial da União Europeia, L139. Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia. Bruxelas.

Regulamento (CE) nº2074/2005 de 5 de Dezembro de 2005. Jornal Oficial da União Europeia, L338. Parlamento Europeu e Conselho da União Europeia. Bruxelas.

Rodriguez-Mahillo, A.I., Gonzalez-Muñoz, M., Gomez-Aguado, F., Rodriguez-Perez, R., Corcuera, M.T., Caballero, M.L. & Moneo, I. (2007). Cloning and characterisation of the *Anisakis simplex* allergen Ani s 4 as a cysteine-protease inhibitor. *International Journal for Parasitology*, 37, 907-917.

Rodriguez-Perez, R., Moneo, I., Rodriguez-Mahillo, A. & Caballero, M.L. (2008). Cloning and expression of Ani s 9, a new *Anisakis simplex* allergen. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 159, 92-97.

Romero, M.C., Valero, A., Navarro-Moll, M.C. & Martín-Sánchez, J. (2013). Experimental comparison of pathogenic potential of two sibling species *Anisakis simplex* s.s. and *Anisakis pegreffii* in Wistar rat. *Tropical Medicine and International Health*, 18(8), 979-984.

Sanches, J. G. (1989). *Nomenclatura portuguesa de organismos aquáticos (Proposta para normalização estatística)*. Lisboa: Publicações avulsas do I.N.I.P., n.º14.

- Sanmartín Durán, M.L., Quinteiro, P. & Ubeira, F.M. (1989). Nematode parasites of commercially important fish in NW Spain. *Diseases of aquatic Organisms*, 7, 75-77.
- Shendure, J. & Ji, H. (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nature Biotechnology*, 26 (10), 1135-1145.
- Shimakura, K., Miura, H., Ikeda, K., Ishizaki, S., Nagashima, Y., Shirai, T., Kasuya, S. & Shiomi, K. (2004). Purification and molecular cloning of a major allergen from *Anisakis simplex*. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 135, 69-75.
- Shimokawa, T., Doihara, T., Makara, M., Miyawaki, K., Nabeka, H., Wakisaka, H., Kobayashi, N. & Matsuda, S. (2012). Lectin Binding Pattern of Gastric Mucosa of Pacific White-Sided Dolphin, *Lagenorhynchus obliquidens*. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 74(2): 155-160.
- Shrestha, S., Kisino, A., Watanabe, M., Itsukaichi, H., Hamasuna, K., Ohno, G. & Tsugu, A. (2014). Intestinal anisakiasis treated successfully with conservative therapy: Importance of clinical diagnosis. *World Journal of Gastroenterology*, 20(2), 598-602.
- Silva, M.E.R. (2002). *Estudo da parasitose de peixes de Portugal por Anisakis sp. (Nematoda Ascaridida): prevalência, intensidade, migração e potencial zoonótico*. Dissertação de mestrado em Hidrobiologia. Porto, Portugal: Faculdade de Ciências, Universidade do Porto.
- Silva, M.E.R. & Eiras, J.C. (2003). Occurrence of *Anisakis* sp. in fishes off the Portuguese West coast and evaluation of its zoonotic potential. *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 23(1), 13-17.
- Soric, R.E., Sequeiros, L.C.M., Miron, L. & Soler, A.P. (2012). Morphometrics for Anisakiasis diagnosis in the North Atlantic horse mackerel (*Trachurus trachurus*). *Scientifica Parasitologica*, 13(2), 77-81.
- Stanley, T. & Wilson, I.G. (2003). Multilocus Enzyme Electrophoresis: A Practical Guide. *Molecular Biotechnology*, 24, 203-220.
- Udo, P.J. & Arazu, V.N. (2011). The Biochemical Composition of Three Exotic Fish Delicacies: *Scomber scombrus*, (Linnaeus, 1758), *Trachurus trachurus* (Linnaeus, 1758) and *Sardina pilchard* (Walbaum, 1792) Frozen and Imported into Nigeria. *Pakistan Journal of Nutrition*, 10(12), 1158-1162.
- Ugland, K.I., Strømnes, E., Berland, B. & Aspholn, P.E. (2004). Growth, fecundity and sex ratio of adult whaleworm (*Anisakis simplex*; Nematoda, Ascaridoidea, Anisakidae) in three whale species from the North-East Atlantic. *Parasitological Research*, 92, 484-489.
- Umehara, A., Kawakami, Y., Araki, J. & Uchida, A. (2007). Molecular identification of the etiological agent of the human anisakiasis in Japan. *Parasitology International*, 56, 211-215.
- Vásquez-Rowe, I., Moreira, M.T. & Feijoo, G. (2010). Life cycle assessment of horse mackerel fisheries in Galicia (NW Spain): Comparative analysis of two major fishing methods. *Fisheries Research*, 106, 517-527.
- Ventura, C.H.D. (2006). *Parasitas do Peixe-espada preto (Aphanopus carbo, Lowe 1839) de Sesimbra e Madeira*. Dissertação de mestrado em Ecologia Aplicada. Porto, Portugal: Faculdade de Ciências, Universidade do Porto.
- Vidaček, S., de las Heras, C., Solas, M.T., Mendizábal, A., Rodríguez-Mahillo, A.I., González-Muñoz, M. & Tejada, M. (2009). *Anisakis simplex* allergens remain active after

conventional or microwave heating and pepsin treatments of chilled and frozen L3 larvae. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89, 1997-2002.

Westermeier, R. (2005). *Electrophoresis in Practice* (4th ed.). Weinheim, Germany: WILEY-VCH, pp. 24-30.

Yankova, M.H., Raykov, V.S. & Frateva, P.B. (2008). Diet Composition of Horse Mackerel, *Trachurus mediterraneus ponticus* Aleev, 1956 (Osteichthyes: Carangidae) in the Bulgarian Black Sea Waters. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 8, 321-327.

Zhang, D.-X. & Hewitt, G.M. (2003). Nuclear DNA analyses in genetic studies of populations: practice, problems and prospects. *Molecular Ecology*, 12, 563-584.

Zhang, L., Du, Xiaojie, An, R., Li, L. & Glasser, R.B. (2013). Identification and genetic characterization of *Anisakis* larvae from marine fishes in the South China Sea using an electrophoretic-guided approach. *Electrophoresis*, 34, 888-894.